

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Katre Teearu

**Enneaegne ovariaalpuudulikkus ja selle geneetilised põhjused**

Bakalaureusetöö

Juhendaja prof. Ants Kurg, Ph.D

Tartu 2014

## SISUKORD

LÜHENDID JA MÕISTED .....	4
SISSEJUHATUS .....	6
1. Enneaegne ovariaalpuudulikkus .....	7
2. POF-i tekkepõhjused .....	7
2.1 POF-i etioloogia .....	7
2.1.1 Folliikulite reservi vähenemine .....	9
3. Geneetilised põhjused.....	10
3.1 X kromosoomi anomaaliad.....	11
3.1.1 X kromosoomi monosoomia .....	11
3.1.2 X kromosoomi trisoomia.....	12
3.1.3 X kromosoomi ümberkorraldused .....	12
3.2 POF-iga seotud geenid X kromosoomis.....	13
3.2.1 <i>FMR1</i> premutatsioon .....	13
3.2.2 <i>BMP15</i> .....	15
3.2.3 <i>FMR2</i> .....	16
3.2.4 Teised kandidaatgeenid X kromosoomis.....	16
3.3 POF-iga seotud geenid autosoomides .....	17
3.3.1 <i>FSHR</i> .....	17
3.3.2 <i>LHR</i> .....	18
3.3.3 <i>INHA</i> .....	18
3.3.4 <i>GDF9</i> .....	19
3.3.5 <i>ESR1</i> .....	20
3.3.6 <i>NOBOX</i> .....	21
3.3.7 <i>FIGLA</i> .....	21
3.3.8 Sündroomne POF – geenid <i>FOXL2</i> , <i>GALT</i> ja <i>AIRE</i> .....	22
4. POF-i tagajärjed.....	24
4.1. Hormoonasendusravi .....	24
4.2 Viljatus .....	25
4.3 Tüvirakkude uuringud POF-i raviks.....	25
5. Ülegenoomsed uuringud.....	27
6. Koopiaarvu variatsioonid ja POF .....	28
6.1 Koopiaarvu analüüs .....	30
7. Arutelu.....	31

KOKKUVÕTE .....	36
SUMMARY .....	37
TÄNUAVALDUSED.....	38
KIRJANDUSE LOETELU.....	39
LISAD .....	49
LISA 1 .....	49
LISA 2 .....	52

## LÜHENDID JA MÕISTED

AFC	antraalsete folliikulite arv ( <i>antral follicle count</i> )
AIRE	autoimmuun regulaator geen ( <i>autoimmune regulator</i> )
AMH	anti-Mülleri hormoon ( <i>anti-Müllerian hormone</i> )
APECED	<i>autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy</i>
APS	autoimmuunne poliendokriinne sündroom ( <i>autoimmune polyendocrine syndrome</i> )
BAC	bakteri kunstlik kromosoom ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )
BPES	<i>blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome</i>
BMP15	luu morfogeneesi valk 15 ( <i>bone morphogenetic protein 15</i> )
aCGH	kiibipõhine võrdlev genoomne hübridisatsioon ( <i>array-based comparative genomic hybridization</i> )
CNV	koopiaarvu variatsioon ( <i>copy number variation</i> )
DGV	genoomsete ümberkorralduste variantide andmebaas ( <i>the Database of Genomic Variants</i> )
ESR1	östrogeeni retseptorgeen 1 ( <i>estrogen receptor 1</i> )
FIGLA	faktor iduliinis alfa ( <i>factor in germline alpha</i> )
FISH	fluorestsents <i>in situ</i> hübridisatsioon ( <i>fluorescence in situ hybridization</i> )
FOXL2	<i>forkhead box protein 2</i>
FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon ( <i>follicle-stimulating hormone</i> )
FSHR	FSH retseptorgeen ( <i>follicle-stimulating hormone receptor</i> )
FMR1	fragiilse X-i vaimse arengu mahajäävuse geen 1 ( <i>the fragile X mental retardation 1</i> )
FMR2	fragiilse X-i vaimse arengu mahajäävuse geen 2 ( <i>the fragile X mental retardation 2</i> )
FRAXA	foliaadi tundlik fragiilsait fragiilse X-i sündroomi suhtes ( <i>fragile site, folic acid type, rare, fra(X)(q27.3) A</i> )
FRAXE	foliaadi tundlik fragiilsait FRAXE sündroomi suhtes ( <i>fragile site, folic acid type, rare, fra(X)(q28) E</i> )
FXTAS	fragiilse X-iga seotud treemor-ataksia sündroom ( <i>fragile X-associated tremor and ataxia syndrome</i> )
FORKO	<i>follitropin receptor knockout</i>
GALT	galaktoos-1-fosfaaturidüültransferaas ( <i>galactose-1-phosphate uridylyltransferase</i> )

GDF9	kasvu- ja diferentseerumisfaktor 9 ( <i>growth differentiation factor 9</i> )
GWAS	ülegenoomsed uuringud ( <i>Genome-Wide Association Studies</i> )
HMM	peidetud Markovi mudel ( <i>hidden Markov model</i> )
HRT	hormoonasendusravi ( <i>hormone replacement therapy</i> )
HuAFC	inimese lootevee rakud ( <i>human amniotic fluid cell</i> )
HuMenSC	inimese endomeetriumi tüvirakud ( <i>human endometrial stem cells</i> )
INHA	inhibiin- $\alpha$ subühiku geen ( <i>inhibin alpha</i> )
IVF	kehaväline viljastamine ( <i>in vitro fertilization</i> )
LH	luteiniseeriv hormoon ( <i>luteinizing hormone</i> )
LHR	LH retseptorgeen ( <i>luteinizing hormone receptor</i> )
NOBOX	vastsündinud munasarja <i>homeobox</i> geen ( <i>newborn ovary homeobox</i> )
PCOS	polütsüstiliste munasarjade sündroom ( <i>polycystic ovary syndrome</i> )
POF	enneaegne ovariaalpuudulikkus ( <i>premature ovarian failure</i> )
SLE	süsteemne erütematoosne luupus ( <i>systemic lupus erythematosus</i> )
SNP	ühenukleotiidne polümorfism ( <i>single nucleotide polymorfism</i> )
TGF $\beta$	transformeeruva kasvufaktor beeta ( <i>transforming growth factor beta</i> )
UCMSC	nabaväädi mesenhümaalsed tüvirakud ( <i>umbilical cord mesenchymal stem cells</i> )

## SISSEJUHATUS

Enneaegne ovariaalpuudulikkus (POF, *premature ovarian failure*) mõjutab umbes 1% alla 40-aastaseid naisi, põhjustades enneaegset munasarjade folliikulite arvu vähenemist ning olles seetõttu üheks peamiseks naiste viljatuse põhjuseks. POF-i olulisus eriti arenenud riikides kasvab pidevalt, kuna naised rasestuvad üha sagedamini 30. ja 40. eluaastates. Seetõttu on oluline tõsta noorte naiste teadlikkust antud haiguse olemasolust.

Olgugi, et suurem osa POF-i esilekutsuvatest mehhanismidest on siiani teadmata, on teadaolevad tekkepõhjused väga heterogeensed, kaasates geneetilisi muutusi, metaboolseid häireid, ravist tingitud faktoreid ja viiruslikke- või autoimmuunhaiguseid. Geneetilist seost antud haigusega toetavad mitmed perekondlikud uuringud. Samuti on leitud, et POF-i võivad põhjustada nii kromosomaalsed häired kui ka üksikud geenimutatsioonid nii X kromosoomis kui autosoomides. Ühtlasi võib POF esineda ka sündroomsel viisil.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on anda kirjandusel põhinev ülevaade enneaegse ovariaalpuudulikkuse tekkepõhjustest, keskendudes peamiselt selle haiguse geneetilisele komponendile ning tutvustada kõrge lahutusvõimega genotüüpiseerimismeetodeid, mis on aidanud avastada uusi potentsiaalseid haigusseoselisi geene ja kromosoomipiirkondi.

Antud töö valmis Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi Biotehnoloogia õppetooli prof. Ants Kure tööühma ning AS Reproduktiivmeditsiini ja -Bioloogia Tehnoloogia Arenduskeskuse koostöö projekti raames, mis keskendub enneaegse ovariaalpuudulikkuse geneetikale ning eelkõige haigusseoseliste koopiaarvu variatsioonide ja kandidaatgeenide leidmisele.

**Märksõnad:** POF, enneaegne ovariaalpuudulikkus, viljatus, X kromosoom, CNV

## 1. Enneaegne ovariaaluudulikkus

Enneaegne munasarjade puudulikkus (POF) on traditsiooniliselt defineeritud kui primaarne ovariaalne defekt, mida iseloomustab puuduv menarhe (primaarne amenorröa) või enam kui neli kuud kestnud menstruatsiooni puudumine (sekundaarne amenorröa), millega kaasneb munasarjade funktsiooni vähenemine enne 40. eluaastat. Biokeemiliselt on see iseloomustatud madalate suguhormoonide tasemega (östrogeenid või inhibiitorid) ja kõrgete gonadotropiinide luteiniseeriva hormooni (LH) ja folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) tasemega. (de Moraes-Ruehsen ja Jones, 1967) Diagnoos kinnitatakse kuuajalise vahetega vereanalüüsist määratud FSH kontsentratsiooniga (tavaliselt üle 40 IU/L). (Goswami ja Conway, 2005) Selline seisund erineb menopausist, kuna 5-10%-l juhtumitest on naised spontaanselt pärast diagnoosi rasestunud. (van Kasteren ja Schoemaker, 1999) Samuti võib pooltel spontaanse POF-iga naistel esineda follikulaarne aktiivsus ja isegi kuni 25%-l ovulatsioon. (Rebar ja Connolly, 1990) Primaarne munasarjade puudulikkus (POI – *primary ovarian insufficiency*) kirjeldati esmakordselt Fuller Albright'i poolt 1942. aastal, kes rõhutas, et esmane defekt on munasarjade funktsioneerimise lõppstaadium, mitte häired gonadotropiinide sünteesis. Oma töös vältis ta ebameeldivat ja ebatäpset mõistet „võimetus“ (*failure*), mis kujutas endast munasarjade funktsiooni ja kontseptsiooni lõplikust. (Jin et al., 2012) Teised autorid on kasutanud veel mõisteid hüpergonadotropne amenorröa, hüpergonadotropne hüpogonadism ja primaarne hüpogonadism. (Rebar, 2009) POF-i esineb üldpopulatsioonis ligikaudu 1:100 <40, 1:1000 <30 ja 1:10 000 <20 aasta vanustest naistest. (Coulam et al., 1986) Konkreetne kliiniline pilt enneaegse ovariaaluudulikkuse puhul puudub. Üldjuhul iseloomustab seda puuduv või ebaregulaarne menstruatsioon või viljatus. Mõnedel patsientidel võivad esineda östrogeeni defitsiidist tulenevad sümptomid nagu kuumahood, öine higistamine, emotsionaalne labiilsus ning düspareuunia. Primaarse amenorröaga patsientidel, kes ei ole kunagi saanud mis tahes vormis eksogeenseid suguhormoone, on taolised sümptomid haruldased. (Rebar, 2009)

## 2. POF-i tekkepõhjused

### 2.1 POF-i etioloogia

Ligikaudu 90% POF-i juhtumitest on idiopaatilised (teadmata põhjustega), seevastu ülejäänud 10% etioloogia on küllaltki heterogeenne (tabel 1), kaasates kromosoomide anomaaliaid, geenimutatsioone, autoimmuunseid kahjustusi, metaboolseid haigusi, infektsioone ja iatrokeenseid (ravist tingitud) faktoreid, mis ühel või teisel viisil viivad folliikulite

väärtalitluse või folliikulite arvu kahanemisele. (Jin et al., 2012; Vujovic, 2009) Kui ovariaalpuudulikkus esineb primaarse amenorröa tõttu, siis hinnanguliselt 50% on seotud ebanormaalse kariotüübiga. Suurem osa spontaanse POF-i tekkepõhjustest on seotud sekundaarse amenorröaga.

**Tabel 1. Enneaegse ovariaalpuudulikkuse klassifikatsioon etioloogia alusel** (Jin et al., 2012 järgi)

Etioloogia	Teadaolevad riskifaktorid	Diagnostilised meetodid
<b>Geneetiline</b>	Kromosomaalsed aberratsioonid	X monosoomia, X trisoomia, X kromosoomi mosaiiksus, deletsioonid, duplikatsioonid või tasakaalustatud X:autosoom translokatsioonid määratud kariotüüpiseerimise või FISH-iga.
	Muteerunud POF-seoselised geenid X kromosoomis	Geneetiline skriining <i>FMR1</i> , <i>BMP15</i> ja teiste võimalike kandidaatgeenide osas.
	Muteerunud POF-seoselised geenid autosoomides	Geneetiline skriining <i>GDF9</i> , <i>FOXL2</i> , <i>FSHR</i> , <i>LHR</i> , <i>INHA</i> jne geenidele.
<b>Metaboolne</b>	Klassikaline galaktoseemia	Perekonna ajalugu, sümptomid, vere, uriini, amniotsenteesi (lootevee) uuringud ensüümide tasemete tuvastamiseks, geneetiline skriining geenile <i>GALT</i> .
	17-OH puudus	Sümptomid, gonadotropiinide seerumi ja adrenaalsete suguhormoonide tasemed, geneetiline skriining 17-hüdroksülaasi suhtes.
<b>Autoimmuunne</b>	Hüpotüreoidism, Addisoni tõbi, tüüp I diabeet, reumatoidartriit, müasteenia, APS, kuiva silma sündroom, SLE vmt	Seerumi uuring munasarjade antikehadest, FSH ja LH retseptorite vastu suunatud antikehade tuvastamine, geneetiline skriining <i>AIRE</i> suhtes.
<b>Iatrogenne</b>	Kemoteraapia	<u>Kõrge risk:</u> alküleerivad ained
		<u>Madalad riskid:</u> vinca alkaloidid, antratsükliin antibiootikumid, antimetaboliidid. Sõltub vanusest ja doosist.
	Kiiritusravi	Sõltub vanusest ja doosist.
	Kirurgilised protseduurid	Ennekõike vaagnaoperatsioonid.
<b>Viirused</b>	Mumps, HIV infektsioon, tsütomegaloviirus	Sümptomid vastavale infektsioonile, antikehade testid.
<b>Elukeskkond</b>	Toksiinid, suitsetamine, lastetus, ebaregulaarsed menstruatsioonitsüklid	
<b>Eksisteerivad somaatilised haigused</b>	Epilepsia	

Ühes uuringus leiti ebanormaalse kariotüübiga patsiente vaid 13%, kellel arenes sekundaarne amenorröa enneaegse ovariaalpuudulikkuse tõttu. Enamikul juhtudest diagnoositakse

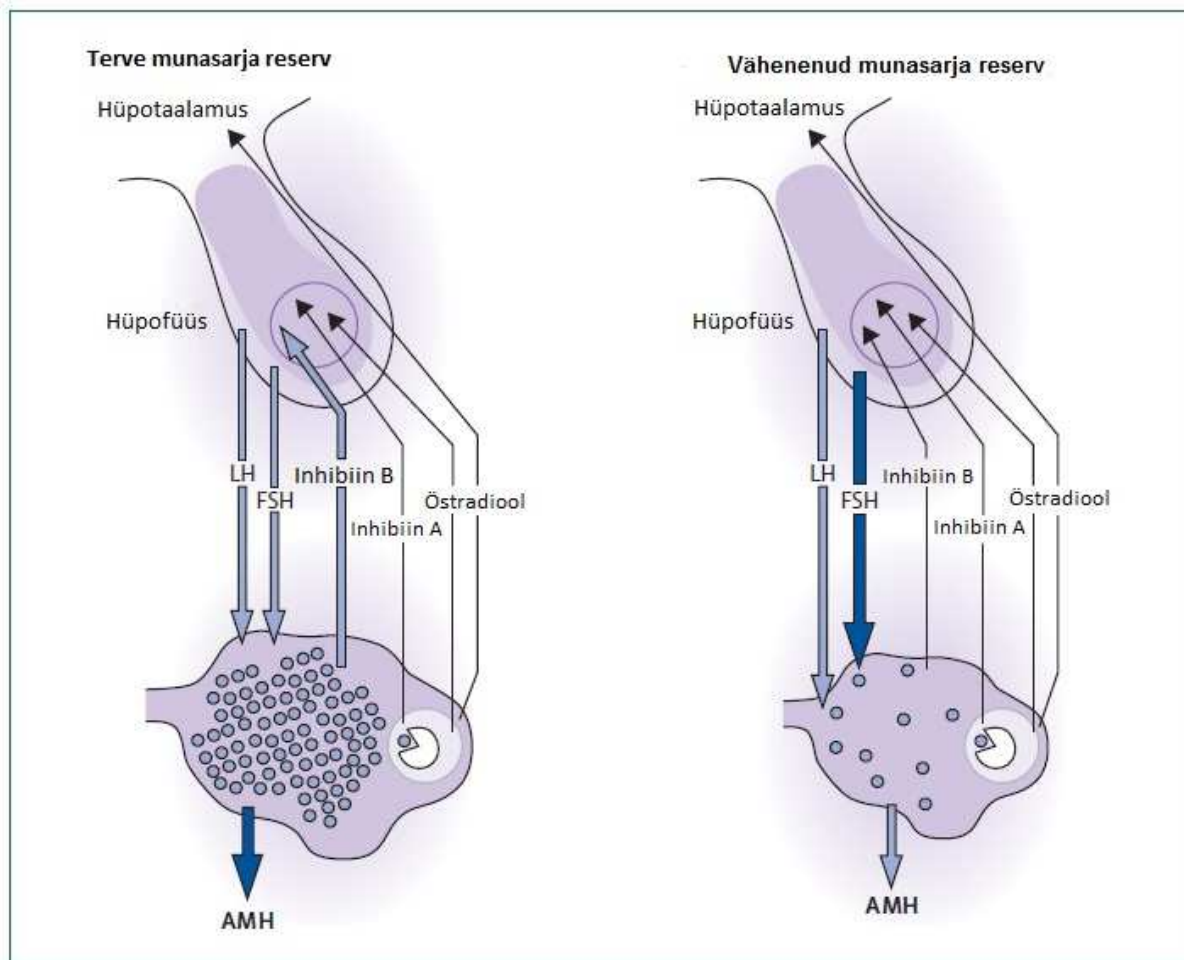


spontaanne POF normaalse kariotüübiga 46,XX. (Rebar, 1982) Erinevad uuringud on näidanud POF-i perekondlikuks esinemissageduseks 4-33%. (Dixit et al., 2010; Laml et al., 2002) Davis jt uurisid idiopaatilist perekondlikku POF-i ning leidsid, et enamik mutatsioone on retsessiivsed, seotud X kromosoomiga ja päranduvad emalt. (Davis et al., 2000)

### 2.1.1 Folliikulite reservi vähenemine

Loote arengu neljandal kuul sisaldavad munasarjad 6-7 miljonit ootsüüti, kaetuna follikulaarepiteeli rakkudega, et moodustuksid primordiaalsed folliikulid. Sünnihetkeks jääb neid apoptoosi tõttu alles ainult 1-2 miljonit. (Markström et al., 2002) Pärast sündi folliikulite arvu vähenemine aeglustub nii, et menarhe alguseks on neid umbes 300 000 kuni 400 000. Reproktiivse ea jooksul on folliikulite arvu vähenemine stabiilne, umbes 1000 folliikulit kuus ning kiireneb pärast 37. eluaastat. Menopausi saabudes on folliikulite arv langenud selgelt alla 1000. (Faddy ja Gosden, 1996) Läänemaailmas on keskmine menopausi saabumise iga 51 eluaastat, kuid see võib varieeruda 40-60 eluaasta vahel. Ovariaalse funktsiooni peatumine enne 40. eluaastat on patoloogiline ja umbes 1%-l naistest areneb enneaegne munasarjade puudulikkus. (Visser et al., 2012) POF-iga naistel esineb varasem primordiaalsete folliikulite vähenemine. Seda ennekõike defektide tõttu ootsüütide apoptoosi mehhanismides, mis viib kas vähenenud folliikulite moodustumise või kiirenenud folliikulite atreesiani. Mõnel juhul on küll folliikulid olemas, kuid need ei allu hormonaalsele stimulatsioonile. (Goswami ja Conway, 2005) Konkreetsed kliinilised testid POF-i võimaliku arengu ennustamiseks senini puuduvad. Biokeemilised markerid (FSH, östradiol), inhibiin B või anti-Mülleri hormoon (AMH) on tänapäeval kõige kasulikumad määramaks diagnoosi, mis osutab ebaregulaarsele tsüklile (joonis 1). (Persani et al., 2010) Munasarjade funktsiooni vähenemist ja selle efekti hüpotaalamus-hüpofüüs-munasarja teljel on laialdaselt uuritud IVF (kehaväline viljastamine, *in vitro fertilization*) patsientidel. On välja töötatud mitmeid munasarjade reservi määravaid teste, näiteks varase follikulaarfaasi FSH ja inhibiin B kontsentratsioonide mõõtmine, samuti ovariaalfolliikulite arvu hindamine transvaginaalse ultrasonograafia abil (AFC, *antral follicle count*). (De Vos et al., 2010) Viimase kümne aasta jooksul on AMH ekspressiooni uurimine munasarjades tõusnud suurema tähelepanu alla, viidates seerum AMH põhise testi võimele ennustada munasarjade reservi. Erinevalt teistest endokriinsetest markeritest ei muutu anti-Mülleri hormooni tase oluliselt menstruatsioonitsükli jooksul. Kuna üksnes arenevad folliikulid produtseerivad AMH-d, siis väljendab AMH tase järelejäänud primordiaalsete folliikulite reservi. (Visser et al., 2012) Ühes uuringus selgus, et nii *FMRI* (fragiilse X-i vaimse arengu mahajäämuse geen 1, *fragile*

*X mental retardation 1*) premutatsiooni kandjatel kui ka mittekandjatel esines 10% AMH taseme langust aastas, kuid premutatsiooni kandjatel olid väärtused üle 50% madalamad kui mittekandjatel. (Spath et al., 2011) Kuigi POF-i tekkepõhjused on suures osas defineerimata, siis haigus avaldub üldiselt ovariaalsete folliikulite vääraltitluse või vähenemise tõttu. (Rebar ja Connolly, 1990) Munasarjade follikulaarse reservi hindamiseks POF-i patsientidel on soovitatud ühe variandina munasarjade biopsiaproovide morfomeetrilist testimist. Praeguseks on aga selles osas tehtud vähe uuringuid. (De Vos et al., 2010)



**Joonis 1. Terve ja vähenenud ovariaalreserviga munasarja ning hüpotaalamus-hüpofüüs-munasarja telje hormoonide kontsentratsioonide muutused** (De Vos et al., 2010 järgi). POF-i korral on iseloomulik FSH taseme tõus ning AMH ja inhibiin B tasemete langus.

### 3. Geneetilised põhjused

Usutakse, et enneaegne ovariaalpuudulikkus tekib mitmete erinevate epigeneetiliste ja geneetiliste faktorite toimel. (Shamilova et al., 2013) Käesolevaks hetkeks on näidatud mitme

geeni osalust POF-i kujunemisel (lisa 1 ja lisa 2), kuid mitte ükski mutatsioon nendes geenides ei näita suuremat seotust enneaegse ovariaalpuudulikkusega kui <10%. Järelikult toetab see vaatenurka POF-ist kui keerulisest multifaktoriaalsest haigusest, mis tõenäoliselt on seotud mitme erineva lookusega. (Stigliani et al., 2013) Et seletada POF-i tekkepõhjuseid, on vaja mõista munasarjade füsioloogiat, regulatsiooni ning nendega seotud geene. Mutatsioonid nendes geenides võivad viia naise viljatusele ning on seetõttu suurema tõenäosusega POF-i kandidaatgeenid. (Dixit et al., 2010) Mitmed geneetilised mehhanismid sisaldavad vähenenud geenidoosi ja mittespetsiifilisi kromosoomi efekte, mis mõjutavad meioosi. Need võivad viia ovariaalpuudulikkuseni, mis on põhjustatud primordiaalsete folliikulite reservi vähenemisest, suurenenud folliikulite atreesiast või puudulikust folliikulite küpsemisest. POF-i tekkepõhjuse selgitamiseks on kasutatud mitmeid meetodeid: (a) kandidaatgeenide mutatsioonanalüüsid; (b) perekondlike seostega analüüsid; (c) transgeensete knock-out loomudelitel kasutamine ja (d) populatsioonigeneetika. (Goswami ja Conway, 2005)

### **3.1 X kromosoomi anomaaliad**

X kromosoomi anomaaliaid on kirjeldatud nii perekondlikel kui ka mitteperekondlikel POF-i patsientidel. Peaaegu kõik defektitüübid on esindatud, kaasates X kromosoomi monosoomiat (Turneri sündroom), X kromosoomi trisoomiat, X kromosoomi mosaiiksust, osalisi deletsioone ja tasakaalustatud X:autosoom translokatsioone. (Jin et al., 2012) X kromosoomi anomaaliad on märkimisväärteks POF-i tekkepõhjusteks kuni 5%-l juhtudest. (Goswami ja Conway, 2005) Kromosoomi aneuploidias või aberratsioonidest tingitud viljatust võib teoreetiliselt seletada mitmeti. Esiteks võivad kromosoomide anomaaliad segada geenide funktsioone, mis on sugunäärmete arenguks olulised ning struktuursed ümberkorraldused X kromosoomis võivad häirida meioosi normaalset toimumist. (Beke et al., 2013) Samuti on X kromosoomis olevad geenid olulised munasarjade normaalseks funktsioneerimiseks. (Simpson ja Rajkovic, 1999)

#### **3.1.1 X kromosoomi monosoomia**

Turneri sündroom (45,X) on üks levinumaid kromosoomianomaaliaid, esinemissagedusega 1:2000 vastsündinud tüdruku kohta. Indiviididel esineb laialdaselt erinevaid füüsilisi ja funktsionaalseid muutusi: lühike kasv, gonaadide düsgenees, kognitiivsed puudused, südame ja neerude anomaaliad ning iseloomulikud fenotüübilised tunnused, nagu nahavolt kaelal, madalad kõrvad ja juuksepiir, lai rind, küünarliigese hüperekstensioon jne. (Persani et al., 2009) Turneri sündroomi puhul tuleneb ovariaalpuudulikkus eelkõige kiirenenud folliikulite

atreesiast, avaldudes tavaliselt lapseas, aga vahel ka hilisemas elus. (Simpson ja Rajkovic, 1999) 45,X patsientide viljatus on põhjustatud ootsüütide vähenemisest varases meioosi profaasis, mis väljendub ovaariumi düsgeneesis ning nõrgenenud munasarjades. (Cordts et al., 2011) Kuna X monosoomiaga loomudelitel esineb normaalne ovariaalne areng, siis eeldatakse, et normaalsel X kromosoomil olevad olulised geenid on inaktiveeritud. (Cox ja Liu, 2014) Samuti võib esineda X kromosoomiga seotud geenide haplopuudulikkus (näiteks *SHOX*), mis füsioloogiliselt pääsevad X inaktivatsioonist ning on munasarjade arenguks olulised kahe koopiana. (Zinn ja Ross, 1998) Alternatiivne seletus on veel, et ovariaalne puudulikkus ei ole lookus-spetsiifiline, vaid pigem mittespetsiifilise meioosivea tulemus. Üksik X kromosoom on võimetu paarduma homoloogi puudumise tõttu. (Simpson, 2008)

### **3.1.2 X kromosoomi trisoomia**

X kromosoomi trisoomia (47,XXX) on sugukromosoomi aneuploidia, mille esinemissagedus naiste hulgas on 1:1000, kuid on ennustatud, et üksnes 10% juhtumitest on diagnoositud. Puberteedi algus ja seksuaalne areng on üldjuhul normaalsed, kuid on mõned juhtumid, kus on kirjeldatud munasarjade või emaka düsgeneesi X trisoomiaga lastel ning noorukitel. Arvatakse, et need X kromosoomi geenid, mis pääsevad inaktivatsioonist, võivad olla 47,XXX patsientidel üleekspresseeritud, mis viib haiguse ilmnemiseni. (Tartaglia et al., 2010) Goswami jt poolt läbiviidud POF-i uuringus oli 3,8% (2/52) enneaegse ovariaalpuudulikkusega naistest X kromosoomi trisoomiaga. 47,XXX puhul on suur osa POF-i juhtumitest seotud autoimmuunhaigustega, sealhulgas autoimmuunse türeoidiidiga. (Goswami et al., 2003)

### **3.1.3 X kromosoomi ümberkorraldused**

X kromosoomi pikas õlas asub kriitiline regioon Xq13.3-q27, mis on munasarjade arengu ja funktsioneerimise seisukohalt väga oluline. (Therman et al., 1990) Munasarjade defekti põhjustavad mehhanismid võivad sõltuda kriitilise regiooni (Xq) suuruselt. Selle alaga piirnevates geenides toimunud ümberkorraldused võivad põhjustada otsest lookuse katkestust või positsiooni efekti. Positsiooni efekt on mehhanism, mille puhul deleteerub või translokeerub regulatoorne domeen genoomi teise piirkonda, mille tagajärjeks võivad olla muutused geenide transkriptsioonis ja ekspressioonis. (Persani et al., 2010) POF-i patsientidel esinevad deletsioonid on lokaliseerunud kromosoomi X piirkonnas Xq21.3-Xq27 (POF1 lookus), seevastu tasakaalustatud X:autosoom translokatsioonid on lokaliseeritud piirkonnas Xq13.3-q21.1 (POF2 lookus). (Shelling, 2010) X kromosoomi deletsioonid on enneaegse

ovariaalpuudulikkuse korral sagedasemad kui translokatsioonid. (Goswami ja Conway, 2005) Translokatsioonid ja struktuursed ümberkorraldused X kromosoomis võivad põhjustada POF-i, kuna normaalne paardumine meioosis on häiritud kromatiini struktuuri muutuste tõttu. (Schlessinger et al., 2002) Üle 40 tasakaalustatud X:autosoom translokatsioonide murdekohtade uurimisel on selgunud viis geeni, mis on otseselt ümberkorraldustest häiritud: *DIAPH2* (*DIA*) (Xq22), *XPNPEP* (Xq25), *POF1B* (Xq21.2), *DACH2* (Xq21.3) ja *CHM* (Xq21.2). Mitmete nende geenide täpne funktsioon on siiski teadmata ja seega nende seostamine POF-i etioloogiaga küsitav, sest väga vähe on indentifitseeritud mutatsioone nendes lookustes. Seda tüüpi ümberkorralduste puhul näib POF olevat sõltumatu X-iga seotud geenidest ja tekib pigem X kromosoomi kriitilisse regiooni translokaliseerunud autosomaalsete munasarjaspetsiifiliste geenide ekspressiooni mahasurumisest või positsiooni efektist. (Stigliani et al., 2013; Toniolo, 2006) Huvitav on asjaolu, et järjepidevalt leitakse gene X kromosoomis ja autosoomides, mis on seotud POF-i fenotüübiga, kuid POF1 regiooni deletsioonid on järjest vähem sellega seotud. (Beke et al., 2013) Paraku ei ole X kromosoomis järjekindlalt leitud mitte ühtki geeni nendes konkreetsetes regioonides (POF1 ja POF2), mis oleks otseselt seotud enneaegse ovariaalpuudulikkusega. (Stigliani et al., 2013)

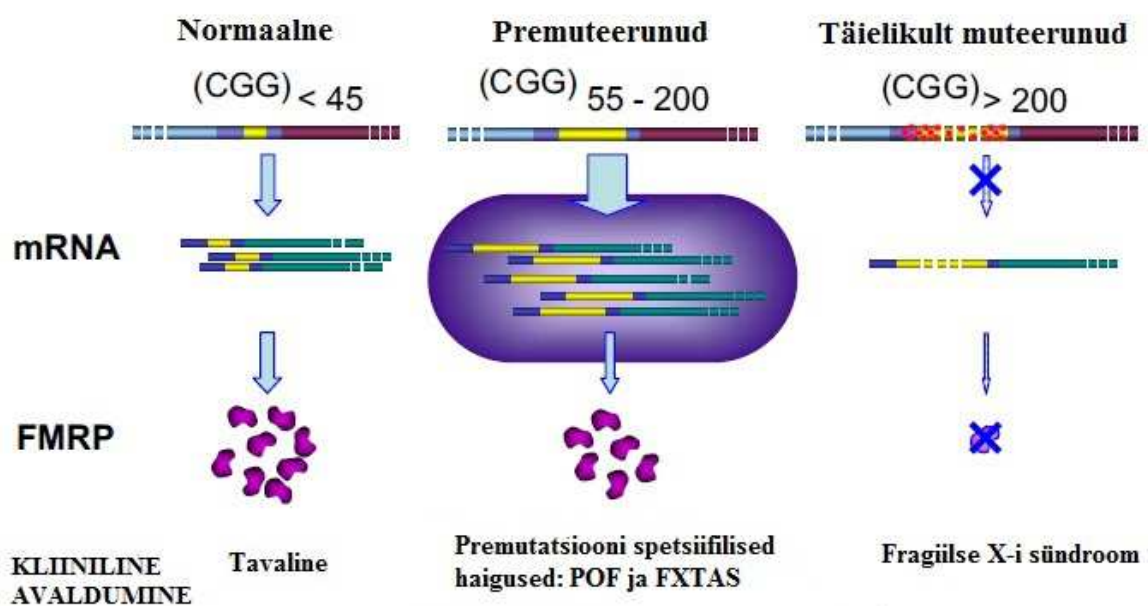
### **3.2 POF-iga seotud geenid X kromosoomis**

Mitmed X kromosoomis lokaliseeruvad geenid on nii perekondlike kui juhuslike POF-i tekkepõhjuste taga. X kromosoomi ümberkorraldused ja hilisemad tsütogeneetilised analüüsid on näidanud kriitilise piirkonna esinemist Xq21.3-Xq27 regioonis. Mitmed uurijad on avaldanud arvamust, et indiviididel, kellel esinevad deletsioonid, translokatsioonid või mutatsioonid selles kriitilises regioonis, esineb POF suurema tõenäosusega. (Dixit et al., 2010) X-iga seotud geenide rolli POF-i kujunemisel on siiski vähe uuritud ja ainult üksikud geenid on hästi iseloomustatud. Huvitav on asjaolu, et need geenid (*FMRI*, *BMP15*, *FMRI2*) ei ole seotud POF-i kandidaatregioonidega. (Toniolo, 2006)

#### **3.2.1 *FMRI* premutatsioon**

*FMRI* geen asub X kromosoomi pikas õlas, positsioonis Xq27.3, väljaspool X kromosoomi POF-i kriitilist regiooni. Mutatsioonid selles geenis võivad viia kolmenukleotiidses kodusjärjestuse (CGG) arvu suurenemisele selle geeni 5' mittetransleeritavas regioonis. Vastavalt kodusjärjestuste arvule on identifitseeritud neli tüüpi alleele: normaalne (6-40), hall tsoon (41-60), premuteerunud (61-200) ning täielikult muteerunud (>200), mis on seotud fragiilse X-i sündroomiga. *FMRI* on ekspresseeritud ootsüütides ja kodeerib

translatsiooniliselt olulist RNA-seoselist valku. (Goswami ja Conway, 2005) Premutatsiooni puhul *FMR1* mRNA süntees kasvab koos CGG kordusjärjestusega, kuid see on seotud omakorda FMRP valgu vähenemisega, mis tuleneb mRNA langenud translatsioonilisest efektiivsusest. (Feng et al., 1995) Premuteerunud alleele on põhiliselt seostatud kahe fenotüübiga: FXTAS ja POF (joonis 2). FXTAS (fragiilse X-iga seotud treemor-ataksia sündroom, *fragile X-associated tremor and ataxia syndrome*) on progresseeruv neurodegeneratiivne haigus, mis mõjutab peamiselt üle 50-aastaseid mehi, kes kannavad *FMR1* premutatsiooni. Haigus avaldub intentsionaalses treemoris ja kõnnaku ataksias, kuid sellega võivad olla seotud ka parkinsonism, kognitiivne taandareng, perifeerne neuropaatia ja autoimmuunhaigused. (Capelli et al., 2010) On mitmeid arutelusid, kuidas premutatsioon võib põhjustada POF-i. Üks hüpotees pakub, et munasarjade väärtalitlus on tingitud vähenenud munasarjade reservist või kiirenenud folliikulite atreesiast. Samuti on pakutud, et muteerunud alleelidelt produtseeritud mRNA-l võib olla toksiline efekt reproduktiivse ea jooksul, mis omakorda viib suurenenud folliikulite atreesiani. (Allen et al., 2007) Täismutatsiooni või normaalset kordusjärjestust kandvatel naistel on samaväärne risk POF-i tekkeks, kuid premuteerunud alleeli kandjatel on risk enneaegseks ovariaalpuudulikkuseks 10 korda suurem. (Conway et al., 1998) *FMR1* premutatsioon esineb naistel sagedusega umbes 1:100-200. (Cordts et al., 2011) Premutatsiooni kandjatest on 0,8-7,5% identifitseeritud sporaadiline enneaegne ovariaalpuudulikkus ning kuni 13% perekondlik POF. (Wittenberger et al., 2007)



**Joonis 2.** *FMR1* ekspressioon normaalse, premutatsiooni ning täismutatsiooni korral (Wittenberger et al., 2007 järgi).

Huvitaval kombel on kordusjärjestuste arvu ning POF-i vaheline seos mittelineaarne, sest risk näib olevat suurem 79-99 CGG korduse ning oluliselt väiksem 55-78 või üle 100 kordusjärjestuste arvu korral. (Allen et al., 2007; Wittenberger et al., 2007) Hiljuti viidi läbi metaanalüüs, kus jaotati erinevad *FMRI* analüüsid alagruppidesse vastavalt uuritud populatsioonidele. Nii saadi kokku 1313 POF-i patsienti ja 3132 kontrollindiviidi. Tulemused näitasid tugevat seost *FMRI* premutatsiooni ja enneaegse ovariaaluudulikkuse vahel. Alagruppide metaanalüüs näitas kõige tugevamat seost Euroopa populatsiooni puhul, mis annab alust arvata, et premutatsiooni esinemine selles populatsioonis tõstab POF-i riski. Aasia ning ka teiste kaasatud populatsioonide puhul nii tugevat seost ei leitud. (Tosh et al., 2014)

### 3.2.2 *BMP15*

Luu morfogeneesi valgud (BMP-d, *bone morphogenetic proteins*) on ekstratsellulaarsed signaliseerivad valgud, kuuludes transformeeruva kasvufaktor beeta (TGF- $\beta$ , *transforming growth factor beta*) superperekonda, mis ühtlasi sisaldab ka kasvu- ja diferentseerumistfaktoreid (GDF, *growth differentiation factor*). *BMP15* on ootsüüdispetsiifiline GDF, mis stimuleerib follikulogeneesi ja granuloosarakkude kasvu ning on ekspresseeritud ootsüütides varase follikulogeneesi käigus. *BMP15* asub X kromosoomi positsioonis Xp11.2. See geen on oletatavasti ekspresseeritud ootsüütides mõlemalt X kromosoomilt ja omab potentsiaalselt geenidoosi efekti. (Goswami ja Conway, 2005) *BMP15* kodeerib pre-pro-proteiini, sisaldades signaalpeptiidi, pro-regiooni ja küpset domeeni, mis on võimeline moodustama homo- või heterodimeere näiteks GDF9 valguga. *BMP15* valgu põhilisteks ülesanneteks on: (a) toetada follikulite küpsemist; (b) reguleerida follikulaarsete sugurakkude tundlikkust FSH aktiivsusele; (c) ennetada sugurakkude apoptoosi; (d) toetada ootsüütide arenguvõimet ja (e) reguleerida ovulatsiooni esinemist. (Persani et al., 2010) *BMP15* inhibeerib peamiselt FSH toimet, surudes alla mRNA ekspressiooni FSH retseptorilt. Vastukaaluks pidurdab FSH *BMP15* produktsiooni doosist sõltuval viisil. (Dixit et al., 2006b) Di Pasquale jt teatasid *BMP15* heterosügootse mutatsiooni (p.Tyr235Cys) olemasolust kahel enneaegse ovariaaluudulikkusega õel. Isa oli hemisügootne kandja, samas kui emal oli normaalne *BMP15* kodeeriv järjestus. Mutatsioon leidis aset kõrgelt konserveerunud alas, mis kodeerib propeptiidi regiooni ning seda ei leitud 120 kontrollisiku alleelides. See on ebatavaline olukord, kus X-liiteline haigus mõjutab heterosügootseid naisi, kes pärisid geneetilise muutuse oma tervelt isalt. (Di Pasquale et al., 2004) On leitud teisigi heterosügootseid variante erinevates populatsioonides Euroopas, USA-s, Põhja-Aafrikas, Indias, Hiinas ja Aasias. (Di Pasquale et al., 2004; Dixit et al., 2006b; Laissue et al., 2006;

Rossetti et al., 2009; Tiotiu et al., 2010; Wang et al., 2010) Seevastu Jaapani ning Uus-Meremaa uuringud ei ole siiani ainsana näidanud seost *BMP15* mutatsioonide ja POF-i vahel (Chand et al., 2006; Takebayashi et al., 2000), kuid need on olnud ka väiksemamahulised analüüsid. Kui ovariaalsed häired on seotud heterosügootse mittefunktsioneeriva *BMP15* mutatsioonidega, siis üks võimalik mehhanism on TGF $\beta$  valkude ebanormaalne dimeriseerumine. (Simpson, 2008) *BMP15* on osutunud tugevaks munasarja patoloogiatega seotud kandidaatgeeniks. Mutatsioonid *BMP15* geenis on seotud nii primaarse kui ka sekundaarse amenorröaga erinevates enneaegse ovariaaluudulikkuse uuringutes 1,5-15%. (Persani et al., 2011)

### 3.2.3 *FMR2*

*FMR2* (fragiilse X-i vaimse arengu mahajäävuse geen 2, *the fragile X mental retardation 2*) geen lokaliseerub 600 aluspaari kaugusel *FMR1* geenist positsioonis Xq28. *FMR2* omab sarnaselt *FMR1*-le trinukleotiidset (GCC) kordusjärjestust esimeses eksonis ning seal esinevad samuti premuteerunud ja täismuteerunud alleelid. *FMR2* on RNA-seoseline valk, mille täpne funktsioon on senini teadmata. Peamiselt seostatakse *FMR2* geeni FRAXE-sündroomiga, kerge kuni mõõduka vaimse arengu mahajäämusega, mis mõjutab 1:50 000 sündinud poisist. (Bensaid et al., 2009) Erinevalt FRAXA-st (folaadi tundlik fragiilsait fragiilse X-i sündroomi suhtes) võib täismutatsioon edasi kanduda nii emalt kui isalt ja kordusjärjestuste vähenemist esineb tavaliselt just isapoolse pärimise käigus. (Hamel et al., 1994) Murray jt leidsid kolm POF-iga naist 147-st (1,5%), kellel esinesid *FMR2* deletsioonid. Kaks mutatsiooni lokaliseerusid *FMR2* oletatava transkriptsioonisaidi läheduses. On usutav, et deletsioonid selles piirkonnas viivad kas transkriptsiooni terminatsioonini või sunnitakse kasutama alternatiivset stardikohta, genereerides vigaseid *FMR2* transkripte. Autorid oletasid, et kuna need deletsioonid esinesid FRAXA-st sõltumatult, võivad deletsioonid *FMR2* geenis olla potentsiaalsed idiopaatilise POF-i tekkepõhjused. (Murray et al., 1999)

### 3.2.4 Teised kandidaatgeenid X kromosoomis

X kromosoomis on leitud veel erinevaid kandidaatgeene POF-i kujunemisel, mis on toodud lisas 1 ja lisas 2. Küll aga vajab nende geenide konkreetsem seostamine haiguse etioloogiaga veel hulgaliselt lisauuringuid.



### 3.3 POF-iga seotud geenid autosoomides

Autosoomides esinevaid kandidaatgeene saab jagada järgnevalt: (a) geenid, mis esmaselt mõjutavad folliikulite funktsiooni avaldudes hormonaalsete efektidena (*FSHR*, *LHR*, *INHA*); (b) geenid, mis mõjutavad primordiaalsete folliikulite edasist arengut (*GDF9*, *FOXL2*) ja (c) DNA-ga seonduvad valgud, transkriptsioonifaktorid (*NOBOX*, *FIGLA*). (Stigliani et al., 2013) Lisaks on toodud erinevad kandidaatgeenid autosoomides lisas 1 ja lisas 2, kuid nende geenide seostamisel POF-i etioloogiaga on vaja läbi viia lisauuringuid.

#### 3.3.1 *FSHR*

FSH retseptor geenil (*FSHR*) on oluline roll folliikulite arengus follikulogeneesi käigus. *FSHR* asub teise kromosoomi positsioonis 2p16.3. Aittomäki jt leidsid mutatsiooni *FSHR* geenis kuues Soome perekonnas. Transfektsiooni eksperimendid näitasid, et konkreetne mutatsioon (c.566C>T, p.Ala189Val) viib märkimisväärse seondumisvõime ja tsükilise AMP hulga vähenemiseni pärast FSH stimulatsiooni, vaatamata nähtavalt normaalsele seondumisafiinsusele rakkudes, mis ekspresseerivad muteerunud retseptorvalku. Vigane *FSHR* valgu vastus FSH stimulatsioonile peatab folliikulite arengu primordiaalses faasis. Heterosügootid selle mutatsiooni osas omasid normaalset fertiilsust. *FSHR* on ainus hästi iseloomustatud autosoom-retsessiivne geen, mis põhjustab mittesündroomset POF-i. (Aittomäki et al., 1995) Konkreetne mutatsioon näib olevat haruldane väljaspool Soomet, sest selliseid mutatsioone ei ole leitud POF-i uuringutes USA-s, Brasiilias, Saksamaal, Mehhikos ja Uus-Meremaal. (da Fonte Kohek et al., 1998; Layman et al., 1998; Woad et al., 2013) Aastal 2002 läbiviidud uuringus leiti ühel primaarse amenorröaga Soome naisel lisaks juba eelpool mainitud mutatsioonile ka uus mutatsioon *FSHR* geenis (c.1255G>A, p.Ala419Thr), mis paiknes *FSHR* 10. eksoni teises transmembraanses domeenis. (Doherty et al., 2002)

Ghadami jt konstrueerisid adenoviirusvektori, mis munasarja rakkudesse sisestatuna ekspresseerib normaalset FSHR valku. Vektor viidi FORKO (*follicle stimulating hormone receptor knockout*) hiiremudelisse, kes omas *FSHR* (-/-) fenotüüpi. Konkreetne vektor oli võimeline 40-50% vähendama FSH taset ning suurendama östrogeeni taset 2-3 korda. Ad-hFSHR rekombinantne viiruse konstrukt oli võimeline taastama *FSHR* funktsiooni munasarjade follikulogeneesis ning on esimene näide geeniteraapiast enneaegse ovariaaluudulikkuse korral. (Ghadami et al., 2010)

### 3.3.2 *LHR*

Luteiniseeriv hormoon (LH) kuulub glükoproteiinide perekonda. Struktuurselt on LH heterodimeer koosnedes kahest erinevast subühikust:  $\alpha$ -subühikust ning hormoonspetsiifilisest  $\beta$ -subühikust. *LHR* geen koosneb 11 eksonist ja asub teise kromosoomi positsioonis 2p16.3, mis on *FSHR*-iga samas lookuses (lisa 2). (Simpson, 2008) Luteiniseerival hormoonil on oluline roll hoida töös progesterooni tootmine kollakeha poolt follikulaarse arengu käigus, stimuleerida steroidhormoonide biosünteesi ja ootsüütide küpsemist, samuti reguleerib LH ovulatsiooni ja folliikulite luteiniseerumist. Korrapäratu LH sekretsioon viib menstruaalhäireteni, polütsüstiliste munasarjade sündroomi (PCOS), korduva raseduse katkemise ning viljatuseni. (Cordts et al., 2011) Latronico jt leidsid naisel, kellel oli kestnud pikaajaline amenorröa, mutatsiooni *LHR* geenis, mis viis stoppkoodoni kasutamiseni positsioonis 1660. Konkreetne mutatsioon põhjustab 6. ja 7. transmembraanse segmendi deletsiooni ja vähenenud retseptori aktiivsuse. (Latronico et al., 1996) Kaks aastat hiljem leidis sama töögrupp *LHR* geenis kaks mikrodeletsiooni (Leu608 ja Val609) seitsmendas transmembraanses regioonis. Patsiendiks oli pseudohermafrodiitne mees, kel ilmneseid naise välised sugutunnused. Tema õel diagnoositi oligomenorröa ning viljatus. (Latronico et al., 1998)

### 3.3.3 *INHA*

Inhibiin on sugunäärme hormoon, mis inhibeerib FSH sünteesi ja sekretsiooni ajuripatsist. Inhibiinid on dimeersed glükoproteiinid, mida produtseeritakse sugunäärmetes. Inhibiiniil on kaks subühikut:  $\alpha$  ja  $\beta$ , mis moodustavad inhibiini A ja B. Mitmetes uuringutes on leitud, et inhibiini väärtuste langemine perimenopausi ajal, olles samaaegselt seotud aktiiviin A suurenenud tasemega, võib olla vastutav kõrgete FSH väärtuste eest, mis iseloomustab reproduktiivset vananemist ja munasarjade reservi vähenemist. Ovariaalpuudulikkus võibki areneda mutatsioonidest *INHA* (inhibiin- $\alpha$  subühiku geen) geenis, põhjustades langenud inhibiini kontsentratsiooni ning tagajärjena suurenenud FSH kontsentratsiooni, mis avaldub suurenenud folliikulite kaasamises iga tsükli vältel ja kõrgeenenud folliikulite arvu kahanemises. (Cordts et al., 2011; Rah et al., 2014) Uuringud Uus-Meremaa, Sloveenia, India ja Itaalia populatsioonides näitasid märkimisväärseid erinevusi *INHA* geeni (2q35) promootori alleelisagedustes POF-iga patsientidel. Nende uuringute kombinatsioon näitab, et mutatsioon p.Gly769Ala *INHA* geenis on märkimisväärne enneaegse ovariaalpuudulikkuse geneetiline marker ning tõenäoliselt juba varases algusjärgus. (Dixit et al., 2004; Marozzi et al., 2002; Shelling et al., 2000) Konkreetne mutatsioon (p.Gly769Ala) aga ei ole leidnud seost

väiksemates uuringutes Korea ning Argentiina naiste hulgas. (Jeong et al., 2004; Sundblad et al., 2006) Korea naiste hulgas läbiviidud uuringud kahe teise polümorfismi suhtes on olnud vastuolulised: Yoon jt ei leinud suurenenud riski *INHA* geeni polümorfismide (p.Cys16Thr ja p.Gly124Ala) ning POF-i vahel (Yoon et al., 2012), kuid Kim jt uuringutulemused näitasid, et nende polümorfismide ning enneaegse munasarjade puudulikkuse vahel on seos olemas. (Kim et al., 2011) Hiljutine uuring Koreas kinnitas nende polümorfismide seotust POF-iga. (Rah et al., 2014) Aastal 2009 viidi läbi suuremõõtmeline analüüs, mis kaasas eelnevalt identifitseeritud *INHA* geeni promootori variante (kokku 611 juhtumit ning 1084 kontrolli). Alleelisagedusi võrreldi sarnaselt Uus-Meremaa populatsiooniuuringuga (Shelling et al., 2000), kuid statistilisi erinevusi patsientide ja kontrollide vahel ei leitud. Autorid järeldasid, et tulemuste erinevus on tingitud väiksemate populatsioonide limiteeritud proovide tõttu ja soovitasid suuremõõtmelisi analüüse selleks, et paremini defineerida haiguse etioloogiat. (Corre et al., 2009)

### 3.3.4 *GDF9*

Kasvu- ja diferentseerumiskasvufaktor 9 geen (*GDF9*) asub 5. kromosoomis (5q31.1) ja ekspresseeritakse ootsüütides, mistõttu arvatakse, et see on oluline nii varases kui ka hilises follikulogeneesis. (Simpson, 2008) *GDF9* mRNA on esmalt ekspresseeritud primordiaalse folliikulite staadiumis ning püsib isegi pärast ovulatsiooni. Primordiaalse folliikulite areng ongi peamiselt reguleeritud *GDF9* poolt. (Dixit et al., 2010) *GDF9* sünteesitakse kui pre-pro-peptiid. Pärast signaalpeptiidi jagunemist moodustab *GDF9* propeptiid homo- ja heterodimeere BMP15 valguga. *Gdf9* nullmutatsiooniga emane hiir on viljatu ning tõestab, et ilma *GDF9* stimulatsioonita primordiaalsed folliikulid ei saa edasi areneda järgmisesse faasi. (Dong et al., 1996) Heterosügootseid *GDF9* geeni mutatsioone on kirjeldatud India, Prantsuse, Ameerika ja Hiina enneaegse ovariaalpuudulikkusega naistel. Dixit jt leidsid mittesünonüümsed SNP-id (ühenukleotiidne polümorfism, *single nucleotide polymorphism*) India populatsioonis *GDF9* propeptiidi regioonis (c.199A>C, p.Lys67Glu ja c.646G>A, p.Val216Met), mis võiksid olla olulised munasarjade arengus. (Dixit et al., 2005) Laissue jt leidsid uue heterosügootse missenssmutatsiooni (p.Ser186Tyr) ühel Prantsuse patsiendil 203-st, mis võib mõjutada normaalset valgu jagunemist või häirida valgu korrektset voltumist. (Laissue et al., 2006) Kovanci jt avaldasid info 61-st uuritud Ameerika naisest ühe heterosügootse missenssmutatsiooni (c.307C>T, p.Pro103Ser) kohta kõrgelt konserveerunud alas. Autorid järeldasid, et taoline mutatsioon võib mõjutada valgu moodustumist, dimerisatsiooni või regulatsiooni kas *GDF9*-l endaga või teiste TGF- $\beta$  perekonnaliikmetega,

näiteks BMP15-ga. (Kovanci et al., 2007) Zhao jt uurisid *GDF9* geeni kodeerivaid järjestusi mutatsioonide osas sajal Hiina enneaegse ovariaalpuudulikkusega naisel ning avastasid kolm uut SNP-i, millest kaks esinesid ka kontrollidel. Seevastu üks (p.Thr238Ala) esines missenssmutatsioonina ja ei leitud ühegi 96 kontrollindiviidi hulgast. (Zhao et al., 2007) Seevastu Jaapani naiste hulgas läbiviidud uuring, leidmaks seoseid *GDF9* mutatsioonide ja POF-i vahel, ei andnud märkimisväärsed tulemusi. (Takebayashi et al., 2000)

### 3.3.5 *ESR1*

Östrogeen toimib läbi östrogeeni retseptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ), mida kodeerib *ESR1* (östrogeeni retseptorgeen 1) hüpotaalamus-hüpofüüs-munasarja teljel, et stimuleerida gonadotropiinide sekretsiooni reguleerimaks follikulogeneesi. *ESR1* (6q25.1) sisaldab kahte üksikut polümorfismi *PvuII* (T-397C) ja *XbaI* (A-351G) restriksioonisaitides ning üht polümorfismi ER  $\alpha$  promootori TA kordusjärjestuses. (Yoon et al., 2010) *ESR1* uuringutega POF-i patsientidel on saadud konfliktseid tulemusi. Bretherick jt seostasid *PvuII* C alleeli polümorfismi *ESR1* geenis enneaegse ovariaalpuudulikkusega. (Bretherick et al., 2008) Yoon jt leidsid jällegi, et *PvuII* polümorfismi TT genotüübi esinemine ja *PvuII/XbaI* polümorfismide TA haplotüüp on seotud POF-iga. (Yoon et al., 2010) Yang jt avastasid väiksema POF-i riski *XbaI* polümorfismi muteerunud alleeli suhtes. (Yang et al., 2010) Hiljuti leidsid M'Rabet jt positiivse seose CC genotüübi ning enneaegse ovariaalpuudulikkuse vahel ning Cordts jt kinnitasid olulist seost POF-i ja *PvuII* polümorfismi C alleeli vahel. (Cordts et al., 2012; M'Rabet et al., 2012) Lisaks on püstitatud hüpotees, et alleelide erinevused *ESR1* geenis võivad reguleerida *ESR1* ekspressiooni ja funktsiooni, mis omakorda mõjutavad östrogeeni bioloogilist toimet ning mõju reproduktiivsele efektiivsusele. (Yoon et al., 2010) Samuti on näidatud, et (TA)<sub>n</sub> kordusjärjestuste arv võib mõjutada geeniekspressiooni. *ESR1* geeni promootoril on väga keeruline genoomne organisatsioon, koosnedes mitmest promootorregioonist koos alternatiivsete lõikesaitidega. (TA)<sub>n</sub> kordusjärjestus võib mõjutada alternatiivsete promootorite kasutamist, väljendudes sobimatus ER  $\alpha$  ekspressioonis. (Bretherick et al., 2008) Syrrou jt panid tähele, et POF-i patsientide hulgas oli väga madal TA kordusjärjestuste arv, kuid Bretherick jt leidsid vastupidise korrelatsiooni, kus hoopis pikenenud TA kordusjärjestus oli seotud enneaegse ovariaalpuudulikkusega. (Bretherick et al., 2008; Syrrou et al., 1999)

### 3.3.6 *NOBOX*

Inimese (positsioonis 7q35) ja hiire *NOBOX* (vastündinud munasarja *homeobox* geen) geenid on eelistatult ekspresseeritud ootsüütides ja kodeerivad homeojärjestuse transkriptsiooni regulaatorit. *Nobox* on väga oluline hiire oogeneesis ja munasarjade arengus. See on kriitilise tähtsusega transkriptsioonifaktor primordiaalseste folliikulite üleminekul primaarseteks ja seda ekspresseeritakse terve follikulogeneesi vältel. (Suzumori et al., 2002) Qin jt poolt läbiviidud uuringus osales 96 enneaegse ovariaalpuudulikkusega USA naist ning avastati seitse teadaolevat SNP-i ja neli uut varianti, millest kaks põhjustavad missensmutatsioone homeojärjestuse domeenis. p.Arg355His mutatsiooni ei esinenud ühelgi 278 kontrollindiviidil, seega järeldati pärast konkreetse mutatsiooni sisseviimist hiire mudelisse, et selline uus mutatsioon häirib *NOBOX* homeodomeeni seondumist DNA-ga. (Qin et al., 2007) Bouilly jt avastasid viis (p.Gly91Trp; p.Arg117Trp; p.Arg303X; p.Ser342Thr ja p.Val350Leu) uut heterosügootset mutatsiooni *NOBOX* geenis 178-st uuritud POF-i patsientide hulgast. Kuna *NOBOX* kuulub homeodomeeni sisaldavate valkude perekonda, mis vahendab valk-DNA interaktsioone, püstitati hüpotees, et nendel konkreetsetel mutatsioonidel on kahjustav efekt seondumaks DNA-ga. Kõik kirjeldatud mutatsioonid näitasid tugevaimat seost (6,2%) seni uuritud autosomaalsetest geenidest, mida POF-i patsientide hulgas uuritud. (Bouilly et al., 2011) Seevastu uuringud Jaapani ja Hiina naiste hulgas ei näidanud usaldusväärseid tulemusi selgitamaks *NOBOX* geeni seotust POF-iga. (Qin et al., 2009; Zhao et al., 2005)

### 3.3.7 *FIGLA*

*FIGLA* (faktor iduliinis alfa) geen, mis asub inimese teises kromosoomis, positsioonis 2p13.3, on sugurakkude spetsiifiline heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktor, mis reguleerib rebukesta (*zona pellucida*) geenide ekspressiooni ning lisaks teisi ootsüüdispetsiifilisi geene. Nii hiires kui inimeses on *FIGLA* ekspresseeritud embrüonaalses sugunäärmes, mis heterodimeriseerub kõikjal leiduva bHLH (aluseline heeliks-ling-heeliks, *basic helix-loop-helix*) TCF3 (transkriptsioonifaktor 3) valguga ning seondub rebukesta geeni promootoriga. (Zhao et al., 2008) Emased *Figla* knock-out hiired ei saa moodustada primordiaalseid folliikuleid ning kaotavad oma ootsüüte väga kiiresti pärast sündi, samas isaste gonaadid on mõjutamata. (Soyal et al., 2000) Zhao jt uurisid 100 enneaegse ovariaalpuudulikkusega Hiina naist, leidmaks mutatsioonanalüüsil seoseid *FIGLA* polümorfismide ning POF-i vahel. Leiti kaks usaldusväärset mutatsiooni, mida ei esinenud ühelgi 304-st kontrollindiviidist. Üks kahest heterosügootsest mutatsioonist oli 22 aluspaari pikkune deletsioon, mis enneaegselt

peatab *FIGLA* transkripti translatsiooni pärast viit aminohapet. Transkriptsioonifaktori haplopuudulikkus on teada põhjus mitme inimese geneetilise sündroomi korral. Teine mutatsioon (c.419-421delACA, p.140delAsn) põhjustab asparagiini puudumise positsioonis 140, mis häirib *FIGLA* valgu seondumist TCF3 bHLH domeeniga. (Zhao et al., 2008)

### 3.3.8 Sündroomne POF – geenid *FOXL2*, *GALT* ja *AIRE*

*FOXL2* (*forkhead box protein 2 gene*) kuulub heeliks-forkhead transkriptsioonifaktorite perekonda ning on teada, et seda ekspresseeritakse arenevates silmalaugudes ning nii inimese kui hiire munasarjades. (Benayoun et al., 2008) *FOXL2* (3q22.3) heterosügootsed mutatsioonid on seotud BPES sündroomiga (*blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome*), autosomaal-dominantse geneetilise haigusega, mille silmalaugude väärareng on kas seotud enneaegse ovariaalpuudulikkusega (BPES tüüp I) või mitte (BPES tüüp II). (Raile et al., 2005) Teatud asjaoludel võivad mutatsioonid *FOXL2* geenis põhjustada rikkeid granuloosarakkude aktiivsuses ja peatada enneaegselt primordiaalse folliikulite kasvu, mis viib POF-i tekkeni. (Harris et al., 2002) Corrêa jt avastasid *de novo* mutatsiooni *FOXL2* geenis (p.864delThy) naisel, kel avaldus sporaadiline BPES ning POF. Konkreetne mutatsioon viib lühenenud valgu produktsioonini, mis on seotud BPES tüüp I fenotüübiga. (Corrêa et al., 2010) Harris jt uurisid 40 Uus-Meremaa ja 30 Sloveenia POF-i patsienti *FOXL2* geeni mutatsioonide osas 200 kontrollindiviidi suhtes. Ühel Uus-Meremaa patsiendil avastati heterosügootne nukleotiidi asendus (c.1009T>A), mis kutsub esile mittekonserveeriva aminohappe vahetuse (p.Tyr258Asn). Taoline polümorfism on küll haruldane, kuid võib omada funktsionaalset efekti ning *FOXL2* valgu puudus võib viia POF-ini. Sloveenia patsiendilt avastati *FOXL2* valgu kümne (14-st)alaniini deletsioon (c.898-927del) valgu heeliks-forkhead domeeni polüalaniini alas. Taoline deletsioon võib viia DNA-ga seondumise vähenemiseni või mutantse alleeli transaktivatsioonini, mis viib valgu haplopuudulikkuseni. (Harris et al., 2002) Bodega jt uurisid 120 enneaegse ovariaalpuudulikkusega naist ning ei leidnud ühtegi patogeenset mutatsiooni *FOXL2* geenis. Autorid järeldasid, et mutatsioonid *FOXL2* kodeerivas järjestuses on pigem haruldased idiopaatilise POF-i tekkes. (Bodega et al., 2004) Siiski, regulatoorsed mutatsioonid, mis mõjutavad eelkõige munasarjade *FOXL2* geeniekspressiooni, usutakse olevat seotud POF-iga ja seetõttu jätkuvad uuringud konserveerunud valgu regioonis. Laissue jt leidsid aga mutatsiooni (p.Gly187Asp) *FOXL2* geenis POF-i patsiendilt ilma BPES sündroomita. *FOXL2*-G187D rakusisene lokalisatsioon oli normaalne, aga selle transaktivatsiooni võime,

mida testiti kahe promootoriga (üks neist seotud munasarjaga), oli oluliselt madalam kui normaalsel FOXL2 valgul. (Laissue et al., 2009)

Kahjustus *GALT* geenis viib galaktoseemiani, väga haruldase autosomaal-retsessiivse haiguseni, mis mõjutab 1:60 000 vastsündinust. *GALT* geen asub 9. kromosoomi positsioonis 9p13.3. Galaktoseemiaga patsientidel on ensüümi galaktoos-1-fosfaaturidüültransferaasi (*GALT*) aktiivsus puudu või esineb vähesel määral. (De Vos et al., 2010) See ensüüm muudab galaktoosi glükoosiks, seega *GALT* geeni homosügootse mutatsiooniga patsientidel puudub selle ensüümi aktiivsus, mis viib galaktoosi metaboliitide kuhjumiseni organismi mitmetes rakutüüpides. Munasarja histoloogia näitas küllaldast ja normaalset folliikulite esinemist 5-päevasel galaktoseemiaga vastsündinul. Seevastu pärast puberteeti esines galaktoseemiat põdevatel naistel vaid üksikuid folliikuleid, mis olid ebaküpsed kuni hüaliniseerunud näitamaks, et folliikulite hävitamine toimub sünnijärgselt. (Welt, 2008) POF-i esineb galaktoseemiat põdevatel naispatsientidel 60-70%. (Laml et al., 2002; Waggoner et al., 1990) Galaktoseemiast on põhjustatud esialgse arvu oogoonide vähenemine, munasarjade folliikulite kahjustused lootearengus ja defektne gonadotropiinide funktsioneerimine. On arvatud, et galaktoosi ja tema toksiliste metaboliitide kuhjumine pärast sündi viib otsese munasarjade kahjustumiseni. (Goswami ja Conway, 2005) Guerrero jt järeldasid oma uuringust, et POF-i kujunemine galaktoseemiaga naistel on tõenäolisem, kui patsiendi genotüüp on Q188R/Q188R, mis on kõige sagedasemini esinev mutatsioon *GALT* geenis. (Guerrero et al., 2000) Seetõttu heterosügootsetel *GALT* p.Gln188Arg mutatsiooniga indiviididel on väiksem risk POF-i tekkeks. (Kaufman et al., 1994)

*AIRE* (autoimmuun regulaator) geeni mutatsioonid põhjustavad inimesel haruldast pärilikku autoimmuunhaigust APECED (*autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*), millega võib kaasneda enneaegne ovariaalpuudulikkus. Varieeruva patoloogiaga haigus koosneb kolmest komponendist: (a) autoimmuunne kudede hävimine, peamiselt endokriinnäärmed; (b) krooniline pindmine kandidoos ja (c) ektodermaalne düstroofia. (Laml et al., 2002) On teada üle 60 *AIRE* geeni (21q22.3) mutatsiooni, sealhulgas mitmed nonsenss-, missenss- ja raaminihkemutatsioonid. (Persani et al., 2010) Ühes Soome uuringus, kus osales 72 patsienti, esines üle 12-aastastest naistest hüpogonadism 60%. (Perheentupa, 1996)

#### 4. POF-i tagajärjed

Enneaegsel ovariaalpuudulikkusel on kahte tüüpi tagajärge. Üks neist on hüpoöstrogenism, mis põhjustab erinevate kudede enneaegset vananemist ning tõstab seetõttu osteoporoosi, kardiovaskulaarsete või neurodegeneratiivsete haiguste riski. Teine tagajärg on viljatus. Hüpoöstrogenismi on võimalik ravida tänapäeval hormoonasendusraviga, kuid viljakust pole pärast POF-i diagnoosimist võimalik taastada. (Persani et al., 2010) Viljatus on märkimisväärne asjaolu enneaegse ovariaalpuudulikkuse all kannatavate naiste hulgas. Mitmetel neist võib küll toimuda ovulatsioon, kuid seda pole võimalik ette ennustada mitte ühegi usaldusväärse meetodiga. Siiski, ovulatsioon ning spontaanne rasestumine võib esineda 5-10%-l patsientidest. (Bidet et al., 2008; van Kasteren ja Schoemaker, 1999)

##### 4.1. Hormoonasendusravi

Pikaajaline hormoonasendusravi (HRT, *hormone replacement therapy*) enneaegse ovariaalpuudulikkuse puhul on vajalik, et leevendada menopausilaadseid sümptomeid ning vältida östrogeeni vähesusest tulenevat terviseriski nagu osteoporoos. (Davis, 1996) Östrogeen on oluline luukoe uuenemises. Östrogeeni doosid peaksid alguses olema võrdväärsed menstruaaltsükli keskmise follikulaarfaasi tasemega, näiteks igapäevaselt 50-100 µg transdermaalset östradiooli. On tõendeid, et transdermaalsel östradioolil on väiksem mõju hemostaatilistele häiretele ning omab madalamat trombemboolia riski kui suukaudne östrogeen. (Jin et al., 2012) Endomeetriumi hüperplaasia riski vähendamiseks tuleb manustada kuus 12 päeva vältel 5-10 mg medroksüprogesteroonatsetaati. Kuigi kliiniliselt puudub ettekirjutus optimaalse HRT pikkuse kohta, siis üldiselt on soovitatud seda jälgida kuni keskmise normaalse menopausi ea saabumiseni. Hormoonasendusravi riskid on madalad ja ei erine kuigivõrd nendest naistest, kes on normaalses premenopausi aegses staadiumis. Patsientidel, kes ei ole hormoonasendusravil, tuleb regulaarselt kontrollida luutihedust. (Cox ja Liu, 2014) Östrogeeni vähesusest on tingitud ka südame- ja veresoonkonnahaiguste kõrgem risk. Langrish jt uurisid kahe aasta vältel HRT mõju kardiovaskulaarsele tervisele POF-i patsientide hulgas. Tulemustest selgus, et hormoonasendusravi saanud naistel oli madalam vererõhk, parem neerufunktsioon ja väiksem reniin-angiotensiin süsteemi (RAS) aktivatsioon. Autorid järeldasid, et HRT on enneaegse ovariaalpuudulikkusega patsientide hulgas oluline ka ennetamaks või vältimaks kardiovaskulaarseid haiguseid. (Langrish et al., 2009)



## 4.2 Viljatus

On läbiviidud mitmeid meditsiinilisi raviprotseduure eesmärgiga indutseerida viljakust POF-i patsientidel, kuid need juhuslikud katsed ei andnud tulemusi taastamiseks ovulatsiooni ning võimalikke rasedusi. Üksnes IVF ja embrüo siirdamine kasutades doonormunarakke on näidanud kõrget edukust ning on pakutud üheks võimalikuks viljakusravi viisiks enneaegse ovariaalpuudulikkusega naistel. (van Kasteren, 2001) Ovulatsiooni taastumise tõenäosust ei ole võimalik ennustada. Samas ei saa eeldada, et viljatus POF-i puhul on püsiv või pöördumatu, sest on juhtumeid, kus hormoonitasemed ja haiguse kulg muutub ning taastub biokeemiliselt normaalsele olukorrale. (Goswami ja Conway, 2005) On mitmeid näiteid, kuidas spontaansed rasedused esinevad naistel, kes manustavad östrogeeni ning huvitav on, et ka kombineeritud rasedusvastaseid vahendeid. Alper jt näitasid, et kuus naist olid võimelised rasestuma pärast POF-i diagnoosi: kaks, kes läbisid östrogeeni teraapiat, kaks, kes manustasid oraalseid kontratseptiive ning kaks naist rasestusid spontaanselt. (Alper et al., 1986) Ühes tagasiulatuvas analüüsis, kus osales 86 enneaegse ovariaalpuudulikkusega naist selgus, et 23-st primaarse amenörröaga patsiendist ei esinenud ovulatsiooni, samas kui seitse 63-st (11,1%) sekundaarse amenörröaga naisest ovuleerisid ning kolm neist rasestusid ja sünnitasid terved lapsed. (Kreiner et al., 1988) Rebar ja Connolly poolt 1990. aastal avaldatud uuringus analüüsiti 115 POF-i patsienti, kellest sekundaarse amenörröaga naistest jätkus perioodiline munasarjade funktsioneerimine. Ovulatsioon tuvastati 24%-l ja rasedus ilmnes 8%-l neist naistest, samas kui primaarse amenörröaga patsientidel ei tuvastatud kumbagi. (Rebar ja Connolly, 1990)

## 4.3 Tüvirakkude uuringud POF-i raviks

Enneaegse ovariaalpuudulikkuse puhul on küll mõned ravistrateegiad välja töötatud, kuid ükski neist ei ole võimeline taastama normaalset viljakust. Viimaste aastate regeneratiivmeditsiini uuringud on toetanud tüvirakkude transplantatsiooni, ravimaks mitmesuguseid haiguseid tänu nende taastootmise- ning diferentseerumispotentsiaalile. Selle idee kohaselt on võimalik tüvirakke kasutada ka POF-i raviks. (Liu et al., 2012) Aastal 2012 viisid Ghadami jt läbi luuüdi tüvirakkude transplantatsiooni uuringu, kus nad kasutasid FORKO (FSHR mutatsiooniga fenotüüp) hiirt, mis on sobilik mudel ovariaalpuudulikkuse uurimiseks. Emasel FORKO hiirel on kõrge FSH tase ja langenud östrogeeni kontsentratsioon. Nad on steriilsed, kuna neil puudub follikulogenees. Luuüdi tüvirakud on paljutöotavad siirdeelemendid ravimaks mitmeid haiguseid, sealhulgas reproduktiivseid düsfunktsioone. Uuringu tulemused näitasid, et veenisiseselt sisestatud luuüdi tüvirakud

stimuleerivad emase FORKO hiire munasarju ekspresseerimaks *FSHR* geeni, taastavad follikulaarse arengu ja steroidhormoonide tootmise. Olenemata sellest, et ravitud emastel ei esinenud ovulatsiooni ja neil ei õnnestunud viljastuda, siis selle uuringu peamine eesmärk on siiski jätkuvate uuringute tegemine, saavutamaks taolise viljatuse ravi inimesel. (Ghadami et al., 2012)

Liu jt poolt viidi läbi katseid uurimaks inimese lootevee mesenhümaalsete tüvirakkude potentsiaali ravimaks enneaegset ovariaalpuudulikkust. Selleks kasutati CD44+/CD105+ inimese lootevee rakkude (HuAFC – *human amniotic fluid cell*) subpopulatsiooni, mis sisestati tsüklofosfamiidiga indutseeritud POF-iga hiiremudelitesse. CD44+/CD105+ HuAFC alapopulatsioon on võimeline diferentseeruma kõigi kolme lootelehe rakkudeks. HuAFC-d ekspresseerivad samuti mitmeid kasvufaktoreid, sealhulgas epidermaalseid kasvufaktoreid (EGF, *epidermal growth factor*), aluselisi fibroblasti kasvufaktoreid (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), diferentseerumis- ja kasvufaktor alfat ja beetat (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) ning luu morfogeneetilist valku 4 (BMP4), lisaks ka tüvirakkude markereid Nanog, Oct4 ja Nestin. HuAFC-d on palju lihtsamini kättesaadavad kui teised täiskasvanu tüvirakud, mis teeb neist potentsiaalsed autoloogsed doonorallikad tüvirakkude teraapiaks. Punaselt fluorestseeruvat valku (RFP, *red fluorescencet protein*) ekspresseerivad HuAFC-d sisestati *in vivo* ja vaadeldi iganädalaselt, et veenduda transplanteeritud tüvirakkude olemasolus munasarjades. Uuringu tulemused näitasid, et isegi kolm nädalat pärast CD44+/105+ HuAFC-de transplantatsiooni oli tuvastatav RFP signaal, samuti näitas läbivoolutsütomeetria (FCM, *flow cytometric*), et lootevee tüvirakud läbisid normaalse rakutsükli ja uuenemise POF-iga hiire munasarjade kudedes. (Liu et al., 2012)

Wang jt kasutasid inimese nabaväädi mesenhümaalseid tüvirakke (UCMSC – *umbilical cord mesenchymal stem cells*) ravimaks POF-i fenotüübiga hiiri. Tulemustest selgus, et pärast UCMSC-de transplantatsiooni munasarjade funktsioon taastus, kuigi rakud ei olnud diferentseerunud folliikulite komponentideks. Granuloosarakkude apoptoos vähenes ning suguhormoonide tase tõusis märgatavalt. Folliikulite arv oli suurem ravitud hiirtel kui kontrollidel. RNA ekspressioonimustri analüüs näitas, et UCMSC-dega ravitud grupp oli sarnasem metsiktüübiga, kui et POF-i fenotüübi kontrollgrupiga. Antud uuring näitas, et UCMSC-d on võimelised päästma hiire munasarjad kahjustustest, põhjustamata immuunsüsteemi äratõukereaktsiooni. (Wang et al., 2013)

Hiljuti kasutasid Liu jt oma katsetes inimese endomeetriumi tüvirakke (HuMenSC – *human endometrial stem cells*) ravimaks POF-i fenotüübiga hiiremudeleid. HuMenSC-d eraldatakse menstruaalverest ja neil on täiskasvanu tüvirakkudele omased jooned: võime ise uueneda, prolifereeruda *in vitro* ning diferentseeruda erinevateks rakutüüpideks. Pärast HuMenSC-de transplantatsiooni tsüklofosfamiidiga indutseeritud POF-iga hiiremudelitesse selgus, et need suutsid sealsetes munasarjades eluvõimelistena püsida vähemalt kaks nädalat ning selgelt oli tuvastatav kõrgem munasarja biomarkerite ekspressioon, nagu AMH, inhibiin  $\alpha$  ja  $\beta$  ning FSHR. Lisaks suurenes ka normaalsete folliikulite arv ja östrogeeni tase. Veelgi enam, mRNA-de ekspressioonimustri analüüs mikrokiipidel näitas, et pärast HuMenSC-de transplantatsiooni oli tuvastatav nende geenide kõrgem ekspressiooni tase, mis on omased normaalsele inimese munasarjale. Need tulemused näitasid, et endomeetriumi tüvirakud indutseeriti POF-i fenotüübiga hiires sealse mikrokeskkonnas diferentseeruma munasarja granuloosa tüüpi rakkudeks ning võiksid olla potentsiaalsed doonorrakud tüvirakkude transplantatsioonil enneaegse ovariaalpuudulikkuse ravil. (Liu et al., 2014)

## 5. Ülegenoomsed uuringud

Viimase kümne aasta jooksul on ülegenoomsed uuringud (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*) arenenud alternatiivseks võimaluseks leidmaks uusi inimeste haiguste kandidaatgeene ja kromosoomi lookusi. Vastupidiselt meetoditele, mis testivad üht või mitut geneetilist regiooni, võimaldab GWAS uurida tervet genoomi. Ülegenoomsed uuringud keskenduvad tavaliselt ühenukleotiidsete polümorfismide ning keeruliste tunnuste seostele, võrreldes konkreetsete patsientide DNA-d kontrollgruppidega. (Stigliani et al., 2013) Esimene GWAS uuring tehti Korea naistega (101 patsienti ja 87 kontrolli), mis leidis, et *PTHBI* (*parathyroid hormone-responsive B1*) geen (7p14.3) võiks olla seotud enneaegse ovariaalpuudulikkusega, olgugi et seda ei ole identifitseeritud munasarjast ning selle füsioloogiline funktsioon on teadmata. (Kang et al., 2008) Ühes teises uuringus (99 patsienti ning 235 kontrolli) selgus, et *ADAMTS19* (*a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif*) geen (5q23.3), mida ekspresseeritakse emase hiire munasarjades, võiks olla seotud POF-i kujunemisega. Teised soovituslikku seost pälvivad geenid selles uuringus olid *BDNF* (11p14.1), *CXCL12* (10q11.21), *LHR* (2p16.3), *USP9X* (Xp11.4) ja *TAF4B* (18q11.2), mis on võimalikud kandidaatgeenid POF-i fenotüübiga loomudelitel uuringutes. (Knauff et al., 2009) Kahes järgnenud GWAS uuringus (He et al., 2009; Stolk et al., 2009), mis keskendusid loomulikus menopausi eas patsientidele, ei leitud

sama lookust. See näitab veelkord, et loomulik menopaus ja POF on reguleeritud mitmete erinevate geenide poolt. Hiljuti läbiviidud suuremahuline GWAS analüüs POF-i patsientide hulgas tehti Hiinas, kus analüüsiti 391 enneaegse ovariaalpuudulikkusega naist ning 895 kontrolli. Kõige märkimisväärsmaks lookuseks kujunes 8q22.3, kus tuvastati kaheksa SNP-i, kuid kus pole siiani kirjeldatud mitte ühtki POF-i kandidaatgeeni. (Qin et al., 2012) Nendel GWAS analüüsidel on siiski mitmed limiteerivad asjaolud. Sõltumatute uuringute kordused on vajalikud selleks, et valepositiivsete tulemuste esinemise tõenäosus on väiksemate uuringute korral kõrgem. GWAS vajaks seega tuhandeid genotüpiseeritud juhtumeid ning terveid kontrole, et saavutada märkimisväärset statistilist jõudu. (Persani et al., 2010)

## **6. Koopiaarvu variatsioonid ja POF**

Hiljutised arengud ja ülegenoomsete struktuursete variantide tehnoloogiate rakendamine võimaldab avastada koopiaarvu muutusi. CNV (*copy number variants*), defineeritud kui üle 1 kb suurune piirkond DNA-s, mille koopiaarv on võrreldes normaalse populatsiooniga erinev ning mis aitab kaasa geneetilise varieeruvuse seostele erinevate haigustega või nende tundlikkusele seoses konkreetse haigusega. (Henrichsen et al., 2009) CNV-de peamised tekkemehhanismid on mittealleelne homologiline rekombinatsioon, mittehologiline DNA otste liitmine, pseudogeenide transpositsioon, tandemkorduste arvu varieeruvus ja matriitsi ümberlülitumise vead või replikatsioonikahvli peatumine. (Connolly et al., 2014) Hiljutised uuringud näitavad, et keskmine inimese genoom sisaldab >1000 CNV, kattes umbes neli miljonit aluspaari. (Conrad et al., 2010; Mills et al., 2011) Praeguseks *the Database of Genomic Variation* (DGV) nimistusse kuulub üle 100 000 publitseeritud ning unikaalse CNV üle terve genoomi. CNV-de funktsionaalsed tagajärjed selgitavad tavaliselt geenidoosi efekti ning on seotud lühenenud valgusjärjestustega ja vähenenud (deletsioonide tulemus) või suurenenud (duplikatsioonide tulemus) valguspressiooniga. CNV-de uurimiseks on välja töötatud erinevaid meetodeid. Kõrge lahutusvõimega tehnoloogiateks CNV-de tuvastamiseks on mikrokiibipõhine genoomne hübriidatsioon (aCGH), ülegenoomsed SNP-kiibid ning teise põlvkonna sekveneerimine. (Connolly et al., 2014) aCGH meetodi puhul märgistatakse test-ja referents-DNA erinevate fluorofooridega ja hübriidiseeritakse koos kiibile. Sellise meetodi peamiseks eeliseks on, et saadav fluorestsentssignaalide suhe on vähem mõjutatud klaasidele kantud proovide kontsentratsioonidest ning slaidide valmistamisel ja töötlemisel tekkivatest variatsioonidest. Viimasel ajal kasutatakse aga üha sagedasemini genotüpiseerimiskiipe. SNP-

d on üha enam arvestatavad variatsioonide allikad ning eriti sobilikud just kõrge lahutusvõimega genotüpiseerimiseks ning haigusseoselisteks uuringuteks. Erinevalt aCGH-st ei hübridiseerita genotüpiseerimiskiibil referents-DNA-d. Need kiibid on veelgi täpsemad ja omavad kõrgemat lahutusvõimet võrreldes aCGH-dega. Tuntumateks kommertsiaalseteks kiibitootjateks on Illumina ning Affymetrix. Olgugi, et algselt arendati genotüpiseerimiskiibid välja SNP-de tuvastamiseks, saab neid edukalt kasutada ka koopiaarvu analüüsiks. (Carter, 2007)

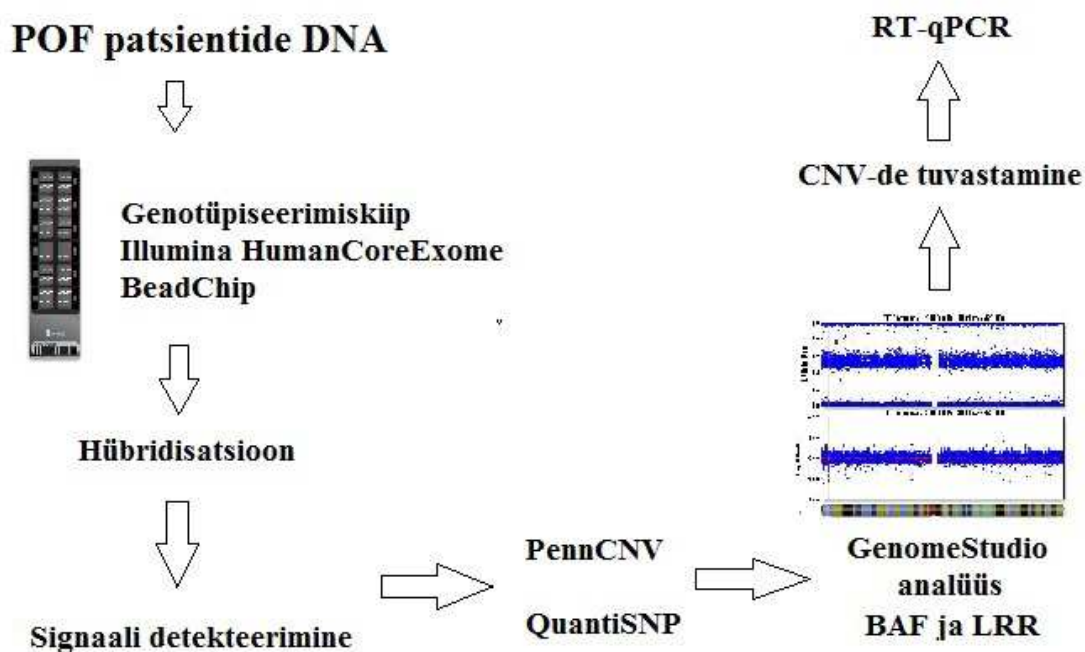
Genotüpiseerimiskiipidelt CNV-de tuvastamiseks on välja töötatud mitmeid algoritme. Illumina arvutitarkvara poolt väljastavaid parameetreid, LRR (*Log R ratio*) ja BAF (*B allele frequency*), kasutavad peidetud Markovi mudelil (HMM, *hidden Markov model*) põhinevad programmid, nagu PennCNV (Wang et al., 2007) ja QuantiSNP (Colella et al., 2007). LogR väärtus näitab kogu fluoreseeruva signaali intensiivsust iga SNP-i mõlemalt alleelilt, B-alleeli sagedus aga ühe SNP alleeli signaaliintensiivsuse osakaalu teise alleeli suhtes. HMM on statistiline meetod, mis kujundab andmeid lähtuvalt peidetud Markovi protsessist, kus iga kindla väärtuse esinemise tõenäosus teatud ajahetkel sõltub ainult eelmistel ajahetkedel esinenud väärtustest. PennCNV ja QuantiSNP algoritmide puhul on peidetud väärtuseks DNA koopiaarv igas uuritud SNP lookuses. (Colella et al., 2007)

Esimene uuring, mis tehti eesmärgiga avastada CNV-de esinemissagedust nii sporaadilise kui perekondliku POF-i puhul, tehti 2009. aastal, kasutades DNA mikrokiipe, mis sisaldasid 4500 BAC-i (bakteri kunstlik kromosoom, *bacterial artificial chromosome*) kloonide üle terve genoomi. Aboura jt analüüsisid 33 primaarse amenorröaga ja 67 varase sekundaarse amenorröaga Prantsuse patsienti. Tulemustest selgus kaheksa statistiliselt olulist CNV erinevust, kusjuures seitse neist ei asunud X kromosoomis. Autorid uurisid nendes piirkondades esinevaid gene ja leidsid, et kaks neist [*DNAH5* (5p15.2) ja *NAIP* (5q13.2)] võivad olla seotud reproduktiivse haigusega, kaks [*DUSP22* (6p25.3) ja *NUPR1* (16p11.2)] võivad olla olulised reproduktiivses endokrinoloogias ja üks [*AKT1* (14q32.33)] follikulogeneesis. (Aboura et al., 2009) Suurema resolutsiooniga oligonukleotiid-mikrokiibid võimaldasid avastada 44 mikroleetsiooni ja -duplikatsiooni, mis võiksid olla potentsiaalsed POF-i haigustekitajad. Need kromosoomide kõrvalekalde regioonid olid aga kahjustanud gene, mis olid seotud hoopis meioosi-, DNA parandus- ja follikulogeneesiradadega. (Ledig et al., 2010) Quilter jt viisid läbi aCGH uuringu 42 idiopaatilise tekke ja tsütogeneetilisel normaalse POF-i patsientidega, et avastada peidetud tähendusega koopiaarvu variatsioone X kromosoomis. Tulemustest selgus, et inimese X kromosoomis on mitmeid diskreetseid

intervalle, mis võivad olla seotud enneaegse ovariaalpuudulikkusega. Nii amplifikatsioonid kui deletsioonid on seotud POF-i fenotüübiga ning antud regioone katvad CNV-d sisaldavad mitmeid kandidaatgeene, mis omavad funktsionaalselt olulisi ülesandeid. (Quilter et al., 2010) Hiljuti läbiviidud SNP kiibipõhine uurimus näitas, et CNV-de seotus POF-iga ning suurem osa kandidaatgeenidest on lokaliseerunud hoopis autosoomides. Võrdluseks ühele avastatud mikrobeletsioonile X kromosoomis (kus asus ka *BMP15* geen), leidsid uurijad seitse uut autosoomset mikrobeletsiooni ja 17 uut autosoomset mikroduplikatsiooni 88-st edukalt kiibistatud POF-iga patsientide hulgast. Huvitav on asjaolu, et mikrobeletsioonid esinesid primaarse amenorröaga naistel 27% ning sekundaarse amenorröaga patsientidel 7%. (McGuire et al., 2011) Selleks, et tulevikus koopiaarvu variatsioonide uuringud enneaegse ovariaalpuudulikkuse korral oleksid edukad, tuleb jälgida mõningaid kriteeriume: (a) väga oluline on täpselt kirjeldada patsientide POF-i fenotüüpi; (b) patsientide ja kontrollide hulk võiks olla arvukas ja homogeenne ja (c) CNV-de detekteerimine ning kvaliteedikontrolli algoritmid peavad olema detailselt kirjeldatud. (Knauff et al., 2011)

## 6.1 Koopiaarvu analüüs

Käesoleva laiema uurimisprojekti eesmärk on kromosomaalse mikrokiibianalüüsi abil tuvastada enneaegse ovariaalpuudulikkusega patsientidel haigusseoselisi koopiaarvu variatsioone ning vastavates piirkondades esinevaid POF-seoselisi potentsiaalseid kandidaatgeene (joonis 3). Uuringus osalevate patsientide (Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu



**Joonis 3.** Käesoleva POF-i uuringu katseskeem.

geenidonorid) DNA proovid analüüsitakse Illumina Infinium<sup>®</sup> HumanCoreExome genotüpiseerimiskiibil (Illumina Inc. San Diego, USA)<sup>2</sup>, mis sisaldab 264,909 ülegenoomset SNP markerit ja lisaks üle 240 000 markeri Illumina HumanExome genotüpiseerimiskiibilt. Ühel kiibil on korraga võimalik analüüsida 12 proovi. Kiibiandmed analüüsitakse Illumina GenomeStudio (versioon 2011.1) arvutitarkvaraga. Saadud signaalide intensiivsuste logaritmiline suhe (LRR – *log R ratio*) ja alleelide intensiivsuste suhe (BAF – *B allele frequency*) kujundati QuantiSNP ning PennCNV programmide jaoks. Kõiki usaldusväärseid koopiaarvu variatsioone võrreldakse genoomsete ümberkorralduste variantide andmebaasis (DGV) olevate CNV-dega. Genotüpiseerimiskiipide abil leitud olulisemad tulemused valideeritakse kasutades RT-qPCR (*real-time quantitative polymerase chain reaction*) tehnoloogiat.

## 7. Arutelu

Enneaegne ovariaalpuudulikkus on keeruline haigus, mis mõjutab naiste viljakust aastaid enne normaalset menopausi. Suurem osa POF-i tekkepõhjustest on idiopaatilised, kuid on näidatud mitme nii X kromosoomis kui ka autosoomides paikneva geeni osalust POF-i kujunemisel, mis on seotud naise reproduktiivsüsteemi arengu ning funktsioneerimisega. Arvatakse, et see haigus võib olla põhjustatud kas munasarjade arengu käigus vähenenud folliikulite arvust või suurenenud folliikulite atreesiast. Enneaegne ovariaalpuudulikkus on heterogeenne geneetiline haigus. Suurem osa POF-i tekkest on sporaadiline, kuid perekondlikuks esinemissageduseks on ennustatud kuni 33% juhtudest. X kromosoomi anomaaliad on tavaliselt seotud deletsioonide või translokatsioonidega, mis võivad viia munasarjade funktsioneerimiseks oluliste geenide kadumisele või häirimisele. Ühtlasi segavad need korrektset meioosi toimumist, mis võib viia folliikulite atreesiani. On leitud, et indiviididel, kel esinevad X kromosoomil asuvas Xq POF-i kriitilises regioonis (Xq13.3-Xq27) deletsioonid, translokatsioonid või mutatsioonid, esineb POF suurema tõenäosusega. (Dixit et al., 2010)

Komplekshaiguse jaoks on keeruline leida üksikut kandidaatgeeni, seepärast on potentsiaalsete geenide nimekiri pikk ja üsna heterogeenne POF-i fenotüübi ning etioloogia osas. X kromosoomis asuvatest kandidaatgeenidest on kõige paremini iseloomustatud ootsüütides ekspresseeritud *FMRI* (Xq27.3). Selle geeni premutatsiooni kandjatel, kelle CGG kordusjärjestuste arv *FMRI* geeni 5' mittetransleeritavas alas on 61-200 vahel, esineb

sporaadiline POF 0,8-7,5% ja perekondlik POF kuni 13% juhtudest. (Wittenberger et al., 2007) Metaanalüüsi tulemused on näidanud kõige suuremat seost premutatsioonide ja POF-i riski vahel Euroopa populatsiooni puhul. (Tosh et al., 2014) Seniajani on aga täpselt teadmata mehhanism, kuidas premutatsioon viib POF-i tekkeni. *FMRI*-st 600 aluspaari kaugusel asuv *FMRI2* geen X kromosoomi pikas õlas (Xq28) ei ole küll nii hästi iseloomustatud, kuid vähesed läbiviidud uuringud on siiski tõestanud, et deletsioonid selles geenis võivad olla idiopaatilise POF-i tekkepõhjusteks. (Murray et al., 1999) Lisaks nendele geenidele on X kromosoomis leidnud suuremat tähelepanu ka *BMP15* (Xp11.2), mis on oluline faktor follikulogeneesis ning FSH inhibitsioonil. Heterosügootsed mutatsioonid selles geenis viivad TGFβ valkude korrapärase dimeriseerumiseni, mis omakorda põhjustab munasarjade funktsioneerimise häireid, viies eelkõige kõrgeks follikuleid stimuleeriva hormooni kontsentratsiooni. Lisaks nimetatutele ja paremini iseloomustatud geenidele on X kromosoomis veel rida kandidaatgeene (lisa 1), mis rohkemal või vähemal määral on seotud naise reproduktiivsüsteemiga. Mitmed neist (*DIAPH2*, *AR*, *BCORL1*) on seotud follikulogeneesiga, teised on jällegi olulised munasarjade arengus (*POF1B*, *CENPI*, *XIST*). Mitmeid neid kandidaatgeene ja veel paljusid teisi, mida tabelis märgitud ei ole, uuritakse aktiivselt ka erinevate loomudelitel peal, nagu hiired, rotid ja puuviljakärbes (*Drosophila*).

Üha rohkem POF-i tekke eest vastutavaid geene leitakse autosoomidest. Mõned neist mõjutavad otseselt ootsüütide või follikulite arvu kahanemist, teised jällegi täidavad erinevaid toimemehhanisme. *GDF9* (5q31.1), olles seotud *BMP15* geeniga, on mõlemad olulised primordiaalse follikulite staadiumis. Autosoomides esinevatest kandidaatgeenidest on *GDF9* üks laialdasemalt uuritud geen erinevates maailma populatsioonides. Heterosügootsed mutatsioonid selles geenis viivad peamiselt korrektse valgu voltumis- ning dimeriseerumisprobleemideni. Gonadotropiinid FSH ja LH on vahendatud spetsiifiliste G-valgu-seoseliste retseptoritega. (Dixit et al., 2010) Mutatsioonid *FSHR* geenis (2p16.3) viivad hüpergonadotroopse hüpogonadismi ehk FSH kontsentratsiooni tõusuni, mis omakorda põhjustab POF-i. Selle geeni mutatsioon leiti esmakordselt Soome populatsioonis 1995. aastal ning on huvitav, et siiani ei ole seda konkreetset mutatsiooni tuvastatud teistes populatsiooniuringutes. Inhibiin on sugunäärme hormoon, mis inhibeerib FSH sünteesi ja sekretsiooni, seetõttu on *INHA* geen (2q35) osutunud tugevaks kandidaatgeeniks enneaegse ovariaalpuudulikkuse kujunemisel. *INHA* geenis toimunud mutatsioon põhjustab langenud inhibiini taset, mille tagajärjel suureneb FSH tase, mis omakorda viib follikulite arvu vähenemiseni. Östrogeen, mis stimuleerib gonadotropiinide vabanemist hüpotaalamus-hüpofüüs-munasarja teljel, toimib läbi östrogeeni retseptorgeeni *ESR1* (6q25.1). Selle geeni



uuringutes POF-i patsientidega on saadud konfliktseid ja vastuolulisi tulemusi, kuid kindel on asjaolu, et alleeli erinevused *ESR1* geenis mõjutavad östrogeeni bioloogilist toimet. Transkriptsioonifaktoritest on kandidaatgeenide nimistusse sattunud *NOBOX* (7q35) ja *FIGLA* (2p13.3). Mõlemad kodeerivad spetsiifilisi transkriptsioonifaktoreid, mis reguleerivad just ootsüütidele omaseid geene. Lisaks neile kahele on suurenenud tähelepanu all ka *FOXO3a* (6q21), mis võib olla seotud *BMP15* geeni regulatiivse aktiivsusega. (Liu et al., 2007) Teistest geenidest on veel huvitavamad näiteks *NANOS3* (19p13.13), mis kodeerib RNA-seoselist valku ja *POLG* (15q26.1), mis on oluline mitokondriaalse DNA (mtDNA) püsivuses, et tagada mitokondrite piisavus follikulogeneesi vältel. Lisaks kirjeldatud geenidele on autosoomides veel rida kandidaatgeene (lisa 1 ja lisa 2), mille täpne funktsioon või seos POF-iga pole veel päris selge. Uurides aja jooksul nende geenide rolli munasarja füsioloogias ning patoloogias ning viies läbi lisauuringuid POF-i fenotüübiga patsientide hulgas, võivad mõned neist kujuneda tulevikus tugevateks kandidaatgeenideks enneaegse ovariaalpuudulikkuse tekkimisel.

Lisaks X kromosoomiga seotud Turneri sündroomile (45,X) põhjustavad enneaegse ovariaalpuudulikkuse sündroomseid vorme ka autosoomides leiduvad geenid, nagu *GALT* (9p13.3), *FOXL2* (3q22.3) ja *AIRE* (21q22.3). Galaktoseemia on haruldane autosomaal-retsessiivne haigus, mida põhjustab ensüümi galaktoos-1-fosfaat uridüültransferaasi aktiivsuse vähesus või puudumine. Munasarjade kahjustumine võib tuleneda galaktoosi metaboliitide toksilisest mõjust, mis põhjustab ootsüütide apoptoosi. Galaktoseemiat põdevatel naistel esineb POF umbes 60-70%. (Laml et al., 2002; Waggoner et al., 1990) *FOXL2* heterosügootsed mutatsioonid on seotud BPES sündroomiga, autosomaal-dominantse geneetilise haigusega, mille tüüp I fenotüüp on seotud enneaegse ovariaalpuudulikkusega. APECED on väga varieeruva patoloogiaga haigus, mida põhjustab mutatsioon *AIRE* geenis. Lisaks mitmetele autoimmuunsetele ilmingutele, esineb seda haigust põdevate naispatsientide hulgas ka POF-i.

POF ei ole enneaegne menopaus, sest kui menopausilaadsed tunnused avalduvad naisel enne 40. eluaastat, siis on tegu patoloogiaga. Hetkel puuduvad head diagnoosimise meetodid prognoosimaks POF-i võimalikku arengut. Perspektiivikamad biomarkerid on seerum AMH ja FSH tasemed ning AFC ning näib, et kvaliteetse ning tugeva geneetilise testi loomiseks ongi tarvis kasutada mitmeid markereid. Kui õnnestuks enneaegse ovariaalpuudulikkuse riski ennustada, siis oleks naistel rohkem võimalusi raseduse planeerimiseks ning vajadusel viljakuse säilitamiseks vastavate tehnoloogiate abil. Kuna naised rasestuvad üha enam 30. või

40. eluaastates, siis on POF-i uurimine väga oluline. Enamikel juhtudest on enneaegne ovariaalpuudulikkus tagasipööramatu olukord, viies viljatuseni reproduktiivses eas naisi. Spontaanse rasestumise tõenäosus on minimaalne, vaid 5-10%. (van Kasteren ja Schoemaker, 1999) POF-i diagnoos on naiste jaoks raske, sest lisaks normaalse fertiilsuse kadumisele kaasneb haigusega mitmeid füsioloogilisi ja psühholoogilisi probleeme. Noored naised on pikemat aega östrogeeni puuduses, mistõttu suureneb risk osteoporoosiks või südame- ja veresoonkonnahaiguste tekkeks, mis omakorda võivad tõsta enneaegse surma riski. Seetõttu on hormoonasendusravi pärast POF-i diagnoosimist väga oluline ja soovitatakse kuni normaalse menopausi ea saabumiseni. Viljatuse raviks või soovitud raseduse saavutamiseks on käesoleval hetkel näidanud kõrget edukust üksnes kehaväline viljastamine (IVF) ja embrüo siirdamine kasutades doonormunarakke.

Viimaste aastate regeneratiivmeditsiini arengud on näidanud, et tüvirakke on võimalik kasutada mitmete inimhaiguste raviks. Ka POF-i puhul on rakendatud kahjustunud munasarjade raviks just tüvirakkude transplantatsiooni meetodeid. Indutseeritud POF-iga hiiremudeleid on proovitud ravida näiteks inimese lootevee mesenhümaalsete tüvirakkude alapopulatsiooni CD44+/CD105+-ga, nabaväädi mesenhümaalsete (UCMSC)-, luuüdi- ja inimese endomeetriumi tüvirakkudega. Nende katsete tulemused näitasid, et üks või teine tüvirakkude liin on rohkemal või vähemal määral võimeline kahjustunud munasarjade funktsiooni taastama. Ühteteks perspektiivikamateks osutusid siiski alles hiljuti katsetatud inimese endomeetriumi tüvirakud (HuMenSC), mis olid pärast transplantatsiooni munasarja mikrokeskkonnas võimelised diferentseeruma granuloosa tüüpi rakkudeks. (Liu et al., 2014) Siiski, tüvirakkude transplantatsiooni ravi eeltingimused peavad olema turvalised ja efektiivsed. Nende rakkude sisestamine peremeesorganismi ei indutseeri mitte üksnes immuunvastust, vaid võib areneda ka soovimatuks vähkkoe. Edasised uuringud selles vallas on kindlasti vajalikud. Lisaks tüvirakkude teraapiale on enneaegse ovariaalpuudulikkuse korral katsetatud ka geeniteraapiat ning seda juba 2010. aastal. Ghadami jt poolt konstrueeritud adenoviirusvektor (Ad-hFSHR) ekspresseeris POF-i fenotüübiga hiire munasarjades korrektset FSHR valku ja taastas selle funktsiooni munasarja follikulogeneesis. (Ghadami et al., 2010) Taolised uuringud on küll veel loomudelitel katsejärgus, kuid omavad tõsiseid väljavaateid arenemaks tulevikus ka inimese viljatuseravi viisideks.

On alust arvata, et POF-i kandidaatgeenide avastamine tulevikus muutub lihtsamaks tänu mikrokiibianalüüsi tehnoloogiate täiustumisele. Ülegenoomseid uuringuid (GWAS) on enneaegse ovariaalpuudulikkuse korral tehtud vähe ning need pole olnud statistiliselt kuigi

võimsad. Koopiaarvu variatsioonide (CNV-d) detekteerimine on jõudnud submikroskoopilisele tasemele. On teada, et need mõjutavad oluliselt geneetilist varieeruvust inimese genoomis ja on seetõttu huviorbiidis ka inimese reproduktiivalastes uuringutes. Ehkki CNV-d võivad viia muutunud geeniekspressioonini häirides regulatoorseid elemente, siis CNV-de peamine patogeenne roll on geenidoosi erinevuste määramine. Kõrge lahutusvõimega genotüpiseerimiskiibid on aidanud tuvastada mitmeid geneetilise riski faktoreid seoses keeruliste geneetiliste haigustega. Koopiaarvu variatsioonide ja POF-i vaheliste seoste leidmiseks on küll tehtud veel vähe uuringuid, kuid need vähesed on tõestanud CNV-de olulistust keerulise haiguse kujunemisel. Edasised analüüsid selles valdkonnas on kindlasti vajalikud, et leida uusi potentsiaalseid kromosoomi lookusi ning kandidaatgeene enneaegse ovariaalpuudulikkuse tekkel. Ka käesoleval hetkel läbiviidav suuremahuline genotüpiseerimisanalüüs Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonoritega, töötab kujuneda enneaegse ovariaalpuudulikkuse uuringute seisukohast kindlasti märkimisväärseks.

## KOKKUVÕTE

Enneaegne ovariaalpuudulikkus on multifaktoriaalne haigus, mis viib viljatuseeni reproduktiivses eas naisi aastaid enne loomulikku menopausi. POF-i diagnoos on naiste jaoks keeruline, sest lisaks normaalse fertiilsuse kadumisele kaasneb haigusega mitmeid füsioloogilisi ja psühholoogilisi probleeme. Östrogeeni defitsiidist tulenevate haiguste riski leevendamiseks, nagu osteoporoos, kardiovaskulaar- või neurodegeneratiivhaigused, on soovitatud POF-i all kannatavatele naistele hormoonasendusravi kuni normaalse menopausi ea saabumiseni. Viljatuse efektiivsemaks raviviisiks ning soovitud raseduse saavutamiseks on hetkel kõregeimat edukust näidanud kehaväline viljastamine.

Komplekshaiguse jaoks on keeruline leida üksikut kandidaatgeeni. POF-iga seotud geenide identifitseerimine on töömahukas, eelkõige nende osaluse tõttu mitmetes bioloogilistes funktsioonides. Viimastel aastatel on avastatud hulgaliselt kandidaatgeene POF-i tekkel nii X kromosoomis kui autosoomides ja paljud neist omavad munasarja füsioloogias olulisi funktsioone. Enneaegne ovariaalpuudulikkus võib esineda nii perekondlikul kui ka sporaadilisel juhul, samuti sündroomsel kui ka mittesündroomsel viisil.

Kõrge lahutusvõimega struktuursete variantide tehnoloogiad on aidanud avastada submikroskoopilisi kromosoomi aberratsioone ning on seetõttu olulised avastamiseks uusi potentsiaalseid kromosoomi lookusi ning kandidaatgeene konkreetse haiguse kujunemisel. Taolised uuringud aitavad lähitulevikus tõsta geneetilise skriiningu tähtsust ja võimalusel arendada välja geneetiline test ennustamiseks ovariaalse funktsiooni langust.

## **Premature ovarian failure and its genetic causes**

Katre Teearu

### **SUMMARY**

Premature ovarian failure is a multifactorial disease that causes infertility in women of reproductive age long before normal menopause. Diagnosis of POF is complicated for women because in addition of normal fertility loss it also involves variety of physiological and psychological problems. Due to oestrogen deficite there are higher risk for many complicated diseases like osteoporosis, cardiovascular or neurodegenerative diseases. Long-term hormonal replacement therapy is needed to relief these risks in women with premature ovarian failure until the normal age of menopause. Only *in vitro* fertilization has demonstrated high success rates and is considered to be the fertility treatment or opportunity to achieve pregnancy in patients with POF.

It is difficult to find a single candidate gene for a complex disease. Identification of the role of some important genes in POF etiology is laborious due to their involvement in several biological functions. In recent years, the candidate gene approach allowed identification of numerous genes involved in POF both in X chromosome and autosomes and many of them have essential function in ovarian physiology. Premature ovarian failure may occur familial as well as sporadically, also syndromic and nonsyndromic form.

Certainly, high-throughput genome-wide structural variation technologies have led to identification of submicroscopic chromosomal aberrations and are important for finding novel chromosomal loci and candidate genes of specific disease. Future studies will help to increase the sensitivity of genetic screening and possibly to develop a genetic test for early prediction of the decrease of ovarian function.

## **TÄNUAVALDUSED**

Eelkõige soovin tänada oma juhendajat prof. Ants Kurge mõistva ja abistava suhtumise eest antud lõputöö valmimisel. Lisaks soovin tänada kogu biotehnoloogia õppetooli toredat kollektiivi, eriti aga Kristine Kreitsmani mitmete kasulike näpunäidete ja toetuse eest.

Kõige suurem ja südamlikum tänu asendamatu abi eest kuulub minu kallitele vanematele, kes võimaldasid mul nädala sees olla Tartus üliõpilase rollis, õppida ja kirjutada oma lõputööd, hoides samal ajal Pärnumaal minu väikest tütart.

- Aboura, A., C. Dupas, G. Tachdjian, M.F. Portnoï, N. Bourcigaux, D. Dewailly, R. Frydman, B. Fauser, N. Ronci-Chaix, B. Donadille, P. Bouchard, and S. Christin-Maitre. 2009. Array comparative genomic hybridization profiling analysis reveals deoxyribonucleic acid copy number variations associated with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:4540-4546.
- Aittomäki, K., J.L. Lucena, P. Pakarinen, P. Sistonen, J. Tapanainen, J. Gromoll, R. Kaskikari, E.M. Sankila, H. Lehväslaiho, A.R. Engel, E. Nieschlag, I. Huhtaniemi, and A. de la Chapelle. 1995. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell.* 82:959-968.
- Allen, E.G., A.K. Sullivan, M. Marcus, C. Small, C. Dominguez, M.P. Epstein, K. Charen, W. He, K.C. Taylor, and S.L. Sherman. 2007. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum Reprod.* 22:2142-2152.
- Alper, M.M., E.E. Jolly, and P.R. Garner. 1986. Pregnancies after premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* 67:59S-62S.
- Beke, A., H. Piko, I. Haltrich, J. Csomor, A. Matolcsy, G. Fekete, J. Rigo, and V. Karcagi. 2013. Molecular cytogenetic analysis of Xq critical regions in premature ovarian failure. *Mol Cytogenet.* 6:62.
- Benayoun, B.A., S. Caburet, A. Dipietromaria, M. Bailly-Bechet, F. Batista, M. Fellous, D. Vaiman, and R.A. Veitia. 2008. The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Hum Mol Genet.* 17:3118-3127.
- Bensaid, M., M. Melko, E.G. Bechara, L. Davidovic, A. Berretta, M.V. Catania, J. Gecz, E. Lalli, and B. Bardoni. 2009. FRAXE-associated mental retardation protein (FMR2) is an RNA-binding protein with high affinity for G-quartet RNA forming structure. *Nucleic Acids Res.* 37:1269-1279.
- Bidet, M., A. Bachelot, and P. Touraine. 2008. Premature ovarian failure: predictability of intermittent ovarian function and response to ovulation induction agents. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 20:416-420.
- Bione, S., F. Rizzolio, C. Sala, R. Ricotti, M. Goegan, M.C. Manzini, R. Battaglia, A. Marozzi, W. Vegetti, L. Dalprà, P.G. Crosignani, E. Ginelli, R. Nappi, S. Bernabini, V. Bruni, F. Torricelli, O. Zuffardi, and D. Toniolo. 2004. Mutation analysis of two candidate genes for premature ovarian failure, DACH2 and POF1B. *Hum Reprod.* 19:2759-2766.
- Bione, S., C. Sala, C. Manzini, G. Arrigo, O. Zuffardi, S. Banfi, G. Borsani, P. Jonveaux, C. Philippe, M. Zuccotti, A. Ballabio, and D. Toniolo. 1998. A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am J Hum Genet.* 62:533-541.
- Bodega, B., C. Porta, P.G. Crosignani, E. Ginelli, and A. Marozzi. 2004. Mutations in the coding region of the FOXL2 gene are not a major cause of idiopathic premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod.* 10:555-557.
- Bonomi, M., E. Somigliana, C. Cacciatore, M. Busnelli, R. Rossetti, S. Bonetti, A. Paffoni, D. Mari, G. Ragni, L. Persani, and I.N.f.t.s.o.O. Dysfunctions. 2012. Blood cell mitochondrial DNA content and premature ovarian aging. *PLoS One.* 7:e42423.
- Bouilly, J., A. Bachelot, I. Broutin, P. Touraine, and N. Binart. 2011. Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat.* 32:1108-1113.

- Bretherick, K.L., C.W. Hanna, L.M. Currie, M.R. Fluker, G.L. Hammond, and W.P. Robinson. 2008. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 89:318-324.
- Capelli, L.P., M.R. Gonçalves, C.C. Leite, E.R. Barbosa, R. Nitrini, and A.M. Vianna-Morgante. 2010. The fragile x-associated tremor and ataxia syndrome (FXTAS). *Arq Neuropsiquiatr.* 68:791-798.
- Carter, N.P. 2007. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat Genet.* 39:S16-21.
- Chand, A.L., A.P. Ponnampalam, S.E. Harris, I.M. Winship, and A.N. Shelling. 2006. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 86:1009-1012.
- Chatterjee, S., R. Singh, S. Kadam, A. Maitra, K. Thangaraj, P. Meherji, and D. Modi. 2009. Longer CAG repeat length in the androgen receptor gene is associated with premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 24:3230-3235.
- Colella, S., C. Yau, J.M. Taylor, G. Mirza, H. Butler, P. Clouston, A.S. Bassett, A. Seller, C.C. Holmes, and J. Ragoussis. 2007. QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res.* 35:2013-2025.
- Connolly, J.J., J.T. Glessner, B. Almoguera, D.R. Crosslin, G.P. Jarvik, P.M. Sleiman, and H. Hakonarson. 2014. Copy number variation analysis in the context of electronic medical records and large-scale genomics consortium efforts. *Front Genet.* 5:51.
- Conrad, D.F., D. Pinto, R. Redon, L. Feuk, O. Gokcumen, Y. Zhang, J. Aerts, T.D. Andrews, C. Barnes, P. Campbell, T. Fitzgerald, M. Hu, C.H. Ihm, K. Kristiansson, D.G. Macarthur, J.R. Macdonald, I. Onyiah, A.W. Pang, S. Robson, K. Stirrups, A. Valsesia, K. Walter, J. Wei, C. Tyler-Smith, N.P. Carter, C. Lee, S.W. Scherer, M.E. Hurles, and W.T.C.C. Consortium. 2010. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 464:704-712.
- Conway, G.S., N.N. Payne, J. Webb, A. Murray, and P.A. Jacobs. 1998. Fragile X premutation screening in women with premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 13:1184-1187.
- Cordts, E.B., D.M. Christofolini, A.A. Dos Santos, B. Bianco, and C.P. Barbosa. 2011. Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Arch Gynecol Obstet.* 283:635-643.
- Cordts, E.B., A.A. Santos, C. Peluso, B. Bianco, C.P. Barbosa, and D.M. Christofolini. 2012. Risk of premature ovarian failure is associated to the PvuII polymorphism at estrogen receptor gene ESR1. *J Assist Reprod Genet.* 29:1421-1425.
- Corre, T., J. Schuettler, S. Bione, A. Marozzi, L. Persani, R. Rossetti, F. Torricelli, I. Giotti, P. Vogt, D. Toniolo, and I.N.f.t.s.o.O. Dysfunctions. 2009. A large-scale association study to assess the impact of known variants of the human INHA gene on premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 24:2023-2028.
- Corrêa, F.J., A.B. Tavares, R.W. Pereira, and M.S. Abrão. 2010. A new FOXL2 gene mutation in a woman with premature ovarian failure and sporadic blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome. *Fertil Steril.* 93:1006.e1003-1006.
- Coulam, C.B., S.C. Adamson, and J.F. Annegers. 1986. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* 67:604-606.
- Cox, L., and J.H. Liu. 2014. Primary ovarian insufficiency: an update. *Int J Womens Health.* 6:235-243.
- da Fonte Kohek, M.B., M.C. Batista, A.J. Russell, K. Vass, L.R. Giacaglia, B.B. Mendonca, and A.C. Latronico. 1998. No evidence of the inactivating mutation (C566T) in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 70:565-567.



- Davis, C.J., R.M. Davison, N.N. Payne, C.H. Rodeck, and G.S. Conway. 2000. Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect: opinion. *Hum Reprod.* 15:2418-2422.
- Davis, S.R. 1996. Premature ovarian failure. *Maturitas.* 23:1-8.
- de Moraes-Ruehsen, M., and G.S. Jones. 1967. Premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 18:440-461.
- De Vos, M., P. Devroey, and B.C. Fauser. 2010. Primary ovarian insufficiency. *Lancet.* 376:911-921.
- Di Pasquale, E., P. Beck-Peccoz, and L. Persani. 2004. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet.* 75:106-111.
- Dixit, H., M. Deendayal, and L. Singh. 2004. Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian women with ovarian failure. *Hum Reprod.* 19:1760-1764.
- Dixit, H., K.L. Rao, V.V. Padmalatha, M. Kanakavalli, M. Deenadayal, N. Gupta, B.N. Chakrabarty, and L. Singh. 2006a. Mutational analysis of the betaglycan gene-coding region in susceptibility for ovarian failure. *Hum Reprod.* 21:2041-2046.
- Dixit, H., L. Rao, V. Padmalatha, T. Raseswari, A.K. Kapu, B. Panda, K. Murthy, D. Tosh, P. Nallari, M. Deenadayal, N. Gupta, B. Chakrabarty, and L. Singh. 2010. Genes governing premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online.* 20:724-740.
- Dixit, H., L.K. Rao, V. Padmalatha, M. Kanakavalli, M. Deenadayal, N. Gupta, B. Chakrabarty, and L. Singh. 2005. Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause.* 12:749-754.
- Dixit, H., L.K. Rao, V.V. Padmalatha, M. Kanakavalli, M. Deenadayal, N. Gupta, B. Chakrabarty, and L. Singh. 2006b. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet.* 119:408-415.
- Doherty, E., P. Pakarinen, A. Tiitinen, A. Kiilavuori, I. Huhtaniemi, S. Forrest, and K. Aittomäki. 2002. A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:1151-1155.
- Dong, J., D.F. Albertini, K. Nishimori, T.R. Kumar, N. Lu, and M.M. Matzuk. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 383:531-535.
- Faddy, M.J., and R.G. Gosden. 1996. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod.* 11:1484-1486.
- Feng, Y., F. Zhang, L.K. Lokey, J.L. Chastain, L. Lakkis, D. Eberhart, and S.T. Warren. 1995. Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science.* 268:731-734.
- Gallardo, T.D., G.B. John, K. Bradshaw, C. Welt, R. Reijo-Pera, P.H. Vogt, P. Touraine, S. Bione, D. Toniolo, L.M. Nelson, A.R. Zinn, and D.H. Castrillon. 2008. Sequence variation at the human FOXO3 locus: a study of premature ovarian failure and primary amenorrhea. *Hum Reprod.* 23:216-221.
- Gao, F., J. Zhang, X. Wang, J. Yang, D. Chen, V. Huff, and Y.X. Liu. 2014. Wt1 functions in ovarian follicle development by regulating granulosa cell differentiation. *Hum Mol Genet.* 23:333-341.
- Ghadami, M., E. El-Demerdash, S.A. Salama, A.A. Binhazim, A.E. Archibong, X. Chen, B.R. Ballard, M.R. Sairam, and A. Al-Hendy. 2010. Toward gene therapy of premature ovarian failure: intraovarian injection of adenovirus expressing human FSH receptor restores folliculogenesis in FSHR(-/-) FORKO mice. *Mol Hum Reprod.* 16:241-250.
- Ghadami, M., E. El-Demerdash, D. Zhang, S.A. Salama, A.A. Binhazim, A.E. Archibong, X. Chen, B.R. Ballard, M.R. Sairam, and A. Al-Hendy. 2012. Bone marrow transplantation restores follicular maturation and steroid hormones production in a mouse model for primary ovarian failure. *PLoS One.* 7:e32462.

- Goswami, D., and G.S. Conway. 2005. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update*. 11:391-410.
- Goswami, R., D. Goswami, M. Kabra, N. Gupta, S. Dubey, and V. Dadhwal. 2003. Prevalence of the triple X syndrome in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders. *Fertil Steril*. 80:1052-1054.
- Guerrero, N.V., R.H. Singh, A. Manatunga, G.T. Berry, R.D. Steiner, and L.J. Elsas. 2000. Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia. *J Pediatr*. 137:833-841.
- Hamel, B.C., A.P. Smits, E. de Graaff, D.F. Smeets, F. Schoute, B.H. Eussen, S.J. Knight, K.E. Davies, C.F. Assman-Hulsmans, and B.A. Oostra. 1994. Segregation of FRAXE in a large family: clinical, psychometric, cytogenetic, and molecular data. *Am J Hum Genet*. 55:923-931.
- Harris, S.E., A.L. Chand, I.M. Winship, K. Gersak, K. Aittomäki, and A.N. Shelling. 2002. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod*. 8:729-733.
- He, C., P. Kraft, C. Chen, J.E. Buring, G. Paré, S.E. Hankinson, S.J. Chanock, P.M. Ridker, D.J. Hunter, and D.I. Chasman. 2009. Genome-wide association studies identify loci associated with age at menarche and age at natural menopause. *Nat Genet*. 41:724-728.
- Henrichsen, C.N., E. Chaignat, and A. Reymond. 2009. Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet*. 18:R1-8.
- Jeong, H.J., S.W. Cho, H.A. Kim, S.H. Lee, J.H. Cho, D.H. Choi, H. Kwon, W.T. Cha, J.E. Han, and K.Y. Cha. 2004. G769A variation of inhibin alpha-gene in Korean women with premature ovarian failure. *Yonsei Med J*. 45:479-482.
- Jiao, X., Y. Qin, G. Li, S. Zhao, L. You, J. Ma, J.L. Simpson, and Z.J. Chen. 2013. Novel NR5A1 missense mutation in premature ovarian failure: detection in Han Chinese indicates causation in different ethnic groups. *PLoS One*. 8:e74759.
- Jin, M., Y. Yu, and H. Huang. 2012. An update on primary ovarian insufficiency. *Sci China Life Sci*. 55:677-686.
- Kang, H., S.K. Lee, M.H. Kim, J. Song, S.J. Bae, N.K. Kim, S.H. Lee, and K. Kwack. 2008. Parathyroid hormone-responsive B1 gene is associated with premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 23:1457-1465.
- Kaufman, F.R., J.K. Reichardt, W.G. Ng, Y.K. Xu, F.R. Manis, C. McBride-Chang, and J.A. Wolff. 1994. Correlation of cognitive, neurologic, and ovarian outcome with the Q188R mutation of the galactose-1-phosphate uridyltransferase gene. *J Pediatr*. 125:225-227.
- Kim, H., S. Chun, B.S. Gu, S.Y. Ku, S.H. Kim, and J.G. Kim. 2011. Relationship between inhibin- $\alpha$  gene polymorphisms and premature ovarian failure in Korean women. *Menopause*. 18:1232-1236.
- Knauff, E.A., H.M. Blauw, P.L. Pearson, K. Kok, C. Wijmenga, J.H. Veldink, L.H. van den Berg, P. Bouchard, B.C. Fauser, L. Franke, and D.P.O.I. Consortium. 2011. Copy number variants on the X chromosome in women with primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril*. 95:1584-1588.e1581.
- Knauff, E.A., L. Franke, M.A. van Es, L.H. van den Berg, Y.T. van der Schouw, J.S. Laven, C.B. Lambalk, A. Hoek, A.J. Goverde, S. Christin-Maitre, A.J. Hsueh, C. Wijmenga, B.C. Fauser, and D.P. Consortium. 2009. Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Hum Reprod*. 24:2372-2378.
- Kosaki, K., S. Sato, T. Hasegawa, N. Matsuo, T. Suzuki, and T. Ogata. 2004. Premature ovarian failure in a female with proximal symphalangism and Noggin mutation. *Fertil Steril*. 81:1137-1139.

- Kovanci, E., J. Rohozinski, J.L. Simpson, M.J. Heard, C.E. Bishop, and S.A. Carson. 2007. Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 87:143-146.
- Kreiner, D., K. Drosch, D. Navot, R. Scott, and Z. Rosenwaks. 1988. Spontaneous and pharmacologically induced remissions in patients with premature ovarian failure. *Obstet Gynecol*. 72:926-928.
- Lacombe, A., H. Lee, L. Zahed, M. Choucair, J.M. Muller, S.F. Nelson, W. Salameh, and E. Vilain. 2006. Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*. 79:113-119.
- Laissue, P., S. Christin-Maitre, P. Touraine, F. Kuttann, O. Ritvos, K. Aittomaki, N. Bourcigaux, L. Jacquesson, P. Bouchard, R. Frydman, D. Dewailly, A.C. Reyss, L. Jeffery, A. Bachelot, N. Massin, M. Fellous, and R.A. Veitia. 2006. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 154:739-744.
- Laissue, P., B. Lakhal, B.A. Benayoun, A. Dipietromaria, R. Braham, H. Elghezal, P. Philibert, A. Saâd, C. Sultan, M. Fellous, and R.A. Veitia. 2009. Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *J Med Genet*. 46:455-457.
- Laml, T., O. Preyer, W. Umek, M. Hengstschlager, and H. Hanzal. 2002. Genetic disorders in premature ovarian failure. *Hum Reprod Update*. 8:483-491.
- Langrish, J.P., N.L. Mills, L.E. Bath, P. Warner, D.J. Webb, C.J. Kelnar, H.O. Critchley, D.E. Newby, and W.H. Wallace. 2009. Cardiovascular effects of physiological and standard sex steroid replacement regimens in premature ovarian failure. *Hypertension*. 53:805-811.
- Latronico, A.C., J. Anasti, I.J. Arnhold, R. Rapaport, B.B. Mendonca, W. Bloise, M. Castro, C. Tsigos, and G.P. Chrousos. 1996. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med*. 334:507-512.
- Latronico, A.C., Y. Chai, I.J. Arnhold, X. Liu, B.B. Mendonca, and D.L. Segaloff. 1998. A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. *Mol Endocrinol*. 12:442-450.
- Layman, L.C., S. Amde, D.P. Cohen, M. Jin, and J. Xie. 1998. The Finnish follicle-stimulating hormone receptor gene mutation is rare in North American women with 46,XX ovarian failure. *Fertil Steril*. 69:300-302.
- Ledig, S., A. Röpke, and P. Wieacker. 2010. Copy number variants in premature ovarian failure and ovarian dysgenesis. *Sex Dev*. 4:225-232.
- Liu, L., S. Rajareddy, P. Reddy, C. Du, K. Jagarlamudi, Y. Shen, D. Gunnarsson, G. Selstam, K. Boman, and K. Liu. 2007. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development*. 134:199-209.
- Liu, T., Y. Huang, L. Guo, W. Cheng, and G. Zou. 2012. CD44+/CD105+ human amniotic fluid mesenchymal stem cells survive and proliferate in the ovary long-term in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Int J Med Sci*. 9:592-602.
- Liu, T., Y. Huang, J. Zhang, W. Qin, H. Chi, J. Chen, Z. Yu, and C. Chen. 2014. Transplantation of Human Menstrual Blood Stem Cells to Treat Premature Ovarian Failure in Mouse Model. *Stem Cells Dev*.
- Lourenço, D., R. Brauner, L. Lin, A. De Perdigo, G. Weryha, M. Muresan, R. Boudjenah, G. Guerra-Junior, A.T. Maciel-Guerra, J.C. Achermann, K. McElreavey, and A.

- Bashamboo. 2009. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 360:1200-1210.
- M'Rabet, N., R. Moffat, S. Helbling, A. Kaech, H. Zhang, and C. de Geyter. 2012. The CC-allele of the PvuII polymorphic variant in intron 1 of the  $\alpha$ -estrogen receptor gene is significantly more prevalent among infertile women at risk of premature ovarian aging. *Fertil Steril*. 98:965-972.e961-965.
- Mandon-Pépin, B., P. Touraine, F. Kuttann, C. Derbois, A. Rouxel, F. Matsuda, A. Nicolas, C. Cotinot, and M. Fellous. 2008. Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 158:107-115.
- Mansouri, M.R., J. Schuster, J. Badhai, E.L. Stattin, R. Lösel, M. Wehling, B. Carlsson, O. Hovatta, P.O. Karlström, I. Golovleva, D. Toniolo, S. Bione, J. Peluso, and N. Dahl. 2008. Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum Mol Genet*. 17:3776-3783.
- Markström, E., E.C.h. Svensson, R. Shao, B. Svanberg, and H. Billig. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 123:23-30.
- Marozzi, A., C. Porta, W. Vegetti, P.G. Crosignani, M.G. Tibiletti, L. Dalprà, and E. Ginelli. 2002. Mutation analysis of the inhibin alpha gene in a cohort of Italian women affected by ovarian failure. *Hum Reprod*. 17:1741-1745.
- Matthews, C.H., S. Borgato, P. Beck-Peccoz, M. Adams, Y. Tone, G. Gambino, S. Casagrande, G. Tedeschini, A. Benedetti, and V.K. Chatterjee. 1993. Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat Genet*. 5:83-86.
- McGuire, M.M., W. Bowden, N.J. Engel, H.W. Ahn, E. Kovanci, and A. Rajkovic. 2011. Genomic analysis using high-resolution single-nucleotide polymorphism arrays reveals novel microdeletions associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 95:1595-1600.
- Mills, R.E., K. Walter, C. Stewart, R.E. Handsaker, K. Chen, C. Alkan, A. Abyzov, S.C. Yoon, K. Ye, R.K. Cheetham, A. Chinwalla, D.F. Conrad, Y. Fu, F. Grubert, I. Hajirasouliha, F. Hormozdiari, L.M. Iakoucheva, Z. Iqbal, S. Kang, J.M. Kidd, M.K. Konkel, J. Korn, E. Khurana, D. Kural, H.Y. Lam, J. Leng, R. Li, Y. Li, C.Y. Lin, R. Luo, X.J. Mu, J. Nemesh, H.E. Peckham, T. Rausch, A. Scally, X. Shi, M.P. Stromberg, A.M. Stütz, A.E. Urban, J.A. Walker, J. Wu, Y. Zhang, Z.D. Zhang, M.A. Batzer, L. Ding, G.T. Marth, G. McVean, J. Sebat, M. Snyder, J. Wang, E.E. Eichler, M.B. Gerstein, M.E. Hurles, C. Lee, S.A. McCarroll, J.O. Korbel, and G. Project. 2011. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature*. 470:59-65.
- Murray, A., J. Webb, N. Dennis, G. Conway, and N. Morton. 1999. Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *J Med Genet*. 36:767-770.
- Pagnamenta, A.T., J.W. Taanman, C.J. Wilson, N.E. Anderson, R. Marotta, A.J. Duncan, M. Bitner-Glindzicz, R.W. Taylor, A. Laskowski, D.R. Thorburn, and S. Rahman. 2006. Dominant inheritance of premature ovarian failure associated with mutant mitochondrial DNA polymerase gamma. *Hum Reprod*. 21:2467-2473.
- Perheentupa, J. 1996. Autoimmune polyendocrinopathy--candidiasis--ectodermal dystrophy (APECED). *Horm Metab Res*. 28:353-356.
- Persani, L., R. Rossetti, and C. Cacciato. 2010. Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol*. 45:257-279.
- Persani, L., R. Rossetti, C. Cacciato, and M. Bonomi. 2009. Primary Ovarian Insufficiency: X chromosome defects and autoimmunity. *J Autoimmun*. 33:35-41.
- Persani, L., R. Rossetti, C. Cacciato, and S. Fabre. 2011. Genetic defects of ovarian TGF- $\beta$ -like factors and premature ovarian failure. *J Endocrinol Invest*. 34:244-251.

- Prueitt, R.L., J.L. Ross, and A.R. Zinn. 2000. Physical mapping of nine Xq translocation breakpoints and identification of XPNPEP2 as a premature ovarian failure candidate gene. *Cytogenet Cell Genet.* 89:44-50.
- Pyun, J.A., D.H. Cha, and K. Kwack. 2012. LAMC1 gene is associated with premature ovarian failure. *Maturitas.* 71:402-406.
- Qin, Y., Y. Choi, H. Zhao, J.L. Simpson, Z.J. Chen, and A. Rajkovic. 2007. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet.* 81:576-581.
- Qin, Y., Y. Shi, Y. Zhao, S.A. Carson, J.L. Simpson, and Z.J. Chen. 2009. Mutation analysis of NOBOX homeodomain in Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 91:1507-1509.
- Qin, Y., H. Zhao, E. Kovanci, J.L. Simpson, Z.J. Chen, and A. Rajkovic. 2008. Analysis of LHX8 mutation in premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 89:1012-1014.
- Qin, Y., H. Zhao, J. Xu, Y. Shi, Z. Li, J. Qiao, J. Liu, C. Qin, C. Ren, J. Li, S. Chen, Y. Cao, J.L. Simpson, Z.J. Chen, and C.P.S. Group. 2012. Association of 8q22.3 locus in Chinese Han with idiopathic premature ovarian failure (POF). *Hum Mol Genet.* 21:430-436.
- Quilter, C.R., A.C. Karcianas, M.R. Bagga, S. Duncan, A. Murray, G.S. Conway, C.A. Sargent, and N.A. Affara. 2010. Analysis of X chromosome genomic DNA sequence copy number variation associated with premature ovarian failure (POF). *Hum Reprod.* 25:2139-2150.
- Rah, H., Y.J. Jeon, Y. Choi, S.H. Shim, T.K. Yoon, D.H. Choi, S.H. Cha, and N.K. Kim. 2012. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T) and thymidylate synthase (TSER and TS 1494del6) polymorphisms with premature ovarian failure in Korean women. *Menopause.* 19:1260-1266.
- Rah, H., Y.J. Jeon, J.J. Ko, J.H. Kim, Y.R. Kim, S.H. Cha, Y. Choi, W.S. Lee, and N.K. Kim. 2014. Association of inhibin  $\alpha$  gene promoter polymorphisms with risk of idiopathic primary ovarian insufficiency in Korean women. *Maturitas.* 77:163-167.
- Raile, K., H. Stobbe, R.B. Tröbs, W. Kiess, and R. Pfäffle. 2005. A new heterozygous mutation of the FOXL2 gene is associated with a large ovarian cyst and ovarian dysfunction in an adolescent girl with blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Eur J Endocrinol.* 153:353-358.
- Rajkovic, A., S.A. Pangas, D. Ballow, N. Suzumori, and M.M. Matzuk. 2004. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science.* 305:1157-1159.
- Rebar, R.W. 1982. Hypergonadotropic amenorrhea and premature ovarian failure: a review. *J Reprod Med.* 27:179-186.
- Rebar, R.W. 2009. Premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* 113:1355-1363.
- Rebar, R.W., and H.V. Connolly. 1990. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril.* 53:804-810.
- Rosen, M.P., S. Shen, C.E. McCulloch, P.F. Rinaudo, M.I. Cedars, and A.T. Dobson. 2007. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ovarian follicular activity. *Fertil Steril.* 88:632-638.
- Rossetti, R., E. Di Pasquale, A. Marozzi, S. Bione, D. Toniolo, P. Grammatico, L.M. Nelson, P. Beck-Peccoz, and L. Persani. 2009. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat.* 30:804-810.
- Schlessinger, D., L. Herrera, L. Crisponi, S. Mumm, A. Percesepe, M. Pellegrini, G. Pilia, and A. Forabosco. 2002. Genes and translocations involved in POF. *Am J Med Genet.* 111:328-333.
- Shamilova, N.N., L.A. Marchenko, N.V. Dolgushina, D.V. Zaletaev, and G.T. Sukhikh. 2013. The role of genetic and autoimmune factors in premature ovarian failure. *J Assist Reprod Genet.* 30:617-622.

- Shelling, A.N. 2010. Premature ovarian failure. *Reproduction*. 140:633-641.
- Shelling, A.N., K.A. Burton, A.L. Chand, C.C. van Ee, J.T. France, C.M. Farquhar, S.R. Milsom, D.R. Love, K. Gersak, K. Aittomäki, and I.M. Winship. 2000. Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 15:2644-2649.
- Simpson, J.L. 2008. Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes. *Ann N Y Acad Sci*. 1135:146-154.
- Simpson, J.L., and A. Rajkovic. 1999. Ovarian differentiation and gonadal failure. *Am J Med Genet*. 89:186-200.
- Soyal, S.M., A. Amleh, and J. Dean. 2000. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*. 127:4645-4654.
- Spath, M.A., T.B. Feuth, E.G. Allen, A.P. Smits, H.G. Yntema, A.G. van Kessel, D.D. Braat, S.L. Sherman, and C.M. Thomas. 2011. Intra-individual stability over time of standardized anti-Mullerian hormone in FMR1 premutation carriers. *Hum Reprod*. 26:2185-2191.
- Stigliani, S., P. Anserini, A.J. Nicoletti, M. di Luca, F. Sozzi, P.L. Venturini, and P. Scaruffi. 2013. Insight into the Genomics of Premature Ovarian Failure. *In J Mol Genet Med*. Vol. 7. 7.
- Stolk, L., G. Zhai, J.B. van Meurs, M.M. Verbiest, J.A. Visser, K. Estrada, F. Rivadeneira, F.M. Williams, L. Cherkas, P. Deloukas, N. Soranzo, J.J. de Keyzer, V.J. Pop, P. Lips, C.E. Lebrun, Y.T. van der Schouw, D.E. Grobbee, J. Witteman, A. Hofman, H.A. Pols, J.S. Laven, T.D. Spector, and A.G. Uitterlinden. 2009. Loci at chromosomes 13, 19 and 20 influence age at natural menopause. *Nat Genet*. 41:645-647.
- Sundblad, V., V.A. Chiauzzi, L. Andreone, S. Campo, E.H. Charreau, and L. Dain. 2006. Controversial role of inhibin alpha-subunit gene in the aetiology of premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 21:1154-1160.
- Suzumori, N., C. Yan, M.M. Matzuk, and A. Rajkovic. 2002. Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mech Dev*. 111:137-141.
- Syrrou, M., I. Georgiou, P.C. Patsalis, I. Bouba, G. Adonakis, and G.N. Pagoulatos. 1999. Fragile X premutations and (TA)<sub>n</sub> estrogen receptor polymorphism in women with ovarian dysfunction. *Am J Med Genet*. 84:306-308.
- Zhao, H., Z.J. Chen, Y. Qin, Y. Shi, S. Wang, Y. Choi, J.L. Simpson, and A. Rajkovic. 2008. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*. 82:1342-1348.
- Zhao, H., Y. Qin, E. Kovanci, J.L. Simpson, Z.J. Chen, and A. Rajkovic. 2007. Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 88:1474-1476.
- Zhao, X.X., N. Suzumori, M. Yamaguchi, and K. Suzumori. 2005. Mutational analysis of the homeobox region of the human NOBOX gene in Japanese women who exhibit premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 83:1843-1844.
- Zinn, A.R., and J.L. Ross. 1998. Turner syndrome and haploinsufficiency. *Curr Opin Genet Dev*. 8:322-327.
- Tachdjian, G., A. Aboura, M.F. Portnoi, M. Pasquier, N. Bourcigaux, T. Simon, G. Rousseau, L. Finkel, M. Benkhalifa, and S. Christin-Maitre. 2008. Cryptic Xp duplication including the SHOX gene in a woman with 46,X, del(X)(q21.31) and premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 23:222-226.
- Takahashi, K., T. Ozaki, M. Okada, H. Kurioka, H. Kanasaki, and K. Miyazaki. 1999. Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 71:96-101.
- Takebayashi, K., K. Takakura, H. Wang, F. Kimura, K. Kasahara, and Y. Noda. 2000. Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 74:976-979.

- Tartaglia, N.R., S. Howell, A. Sutherland, R. Wilson, and L. Wilson. 2010. A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis.* 5:8.
- Therman, E., R. Laxova, and B. Susman. 1990. The critical region on the human Xq. *Hum Genet.* 85:455-461.
- Tiotiu, D., B. Alvaro Mercadal, R. Imbert, J. Verbist, I. Demeestere, A. De Leener, Y. Englert, G. Vassart, S. Costagliola, and A. Delbaere. 2010. Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 25:1581-1587.
- Toniolo, D. 2006. X-linked premature ovarian failure: a complex disease. *Curr Opin Genet Dev.* 16:293-300.
- Tosh, D., K.L. Rao, H.S. Rani, D.A. Deenadayal, U.S. Murty, and P. Grover. 2014. Association between fragile X premutation and premature ovarian failure: a case-control study and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.*
- Waggoner, D.D., N.R. Buist, and G.N. Donnell. 1990. Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases. *J Inherit Metab Dis.* 13:802-818.
- van Kasteren, Y. 2001. Treatment concepts for premature ovarian failure. *J Soc Gynecol Investig.* 8:S58-59.
- van Kasteren, Y.M., and J. Schoemaker. 1999. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Hum Reprod Update.* 5:483-492.
- Wang, B., Q. Wen, F. Ni, S. Zhou, J. Wang, Y. Cao, and X. Ma. 2010. Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf).* 72:135-136.
- Wang, K., M. Li, D. Hadley, R. Liu, J. Glessner, S.F. Grant, H. Hakonarson, and M. Bucan. 2007. PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res.* 17:1665-1674.
- Wang, S., L. Yu, M. Sun, S. Mu, C. Wang, D. Wang, and Y. Yao. 2013. The therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice premature ovarian failure. *Biomed Res Int.* 2013:690491.
- Welt, C.K. 2008. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf).* 68:499-509.
- Visser, J.A., I. Schipper, J.S. Laven, and A.P. Themmen. 2012. Anti-Müllerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. *Nat Rev Endocrinol.* 8:331-341.
- Wittenberger, M.D., R.J. Hagerman, S.L. Sherman, A. McConkie-Rosell, C.K. Welt, R.W. Rebar, E.C. Corrigan, J.L. Simpson, and L.M. Nelson. 2007. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril.* 87:456-465.
- Woad, K.J., D. Prendergast, I.M. Winship, and A.N. Shelling. 2013. FSH receptor gene variants are rarely associated with premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online.* 26:396-399.
- Wu, X., B. Wang, Z. Dong, S. Zhou, Z. Liu, G. Shi, Y. Cao, and Y. Xu. 2013. A NANOS3 mutation linked to protein degradation causes premature ovarian insufficiency. *Cell Death Dis.* 4:e825.
- Vujovic, S. 2009. Aetiology of premature ovarian failure. *Menopause Int.* 15:72-75.
- Yang, J.J., L.Y. Cho, Y.J. Lim, K.P. Ko, K.S. Lee, H. Kim, S.V. Yim, S.H. Chang, and S.K. Park. 2010. Estrogen receptor-1 genetic polymorphisms for the risk of premature ovarian failure and early menopause. *J Womens Health (Larchmt).* 19:297-304.
- Yoon, S.H., Y.M. Choi, M.A. Hong, B.M. Kang, J.J. Kim, E.G. Min, J.G. Kim, and S.Y. Moon. 2008. X chromosome inactivation patterns in patients with idiopathic premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 23:688-692.

- Yoon, S.H., Y.M. Choi, M.A. Hong, J.J. Kim, H.J. Im, G.H. Lee, B.M. Kang, and S.Y. Moon. 2012. Inhibin  $\alpha$  gene promoter polymorphisms in Korean women with idiopathic premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 27:1870-1873.
- Yoon, S.H., Y.M. Choi, M.A. Hong, G.H. Lee, J.J. Kim, H.J. Im, E.G. Min, B.M. Kang, B.K. Yoon, and S.Y. Moon. 2010. Estrogen receptor {alpha} gene polymorphisms in patients with idiopathic premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 25:283-287.

**Kasutatud veebiaadressid:**

<sup>1</sup> <http://www.omim.org/>

<sup>2</sup> <http://www.illumina.com/>



## LISAD

### LISA 1

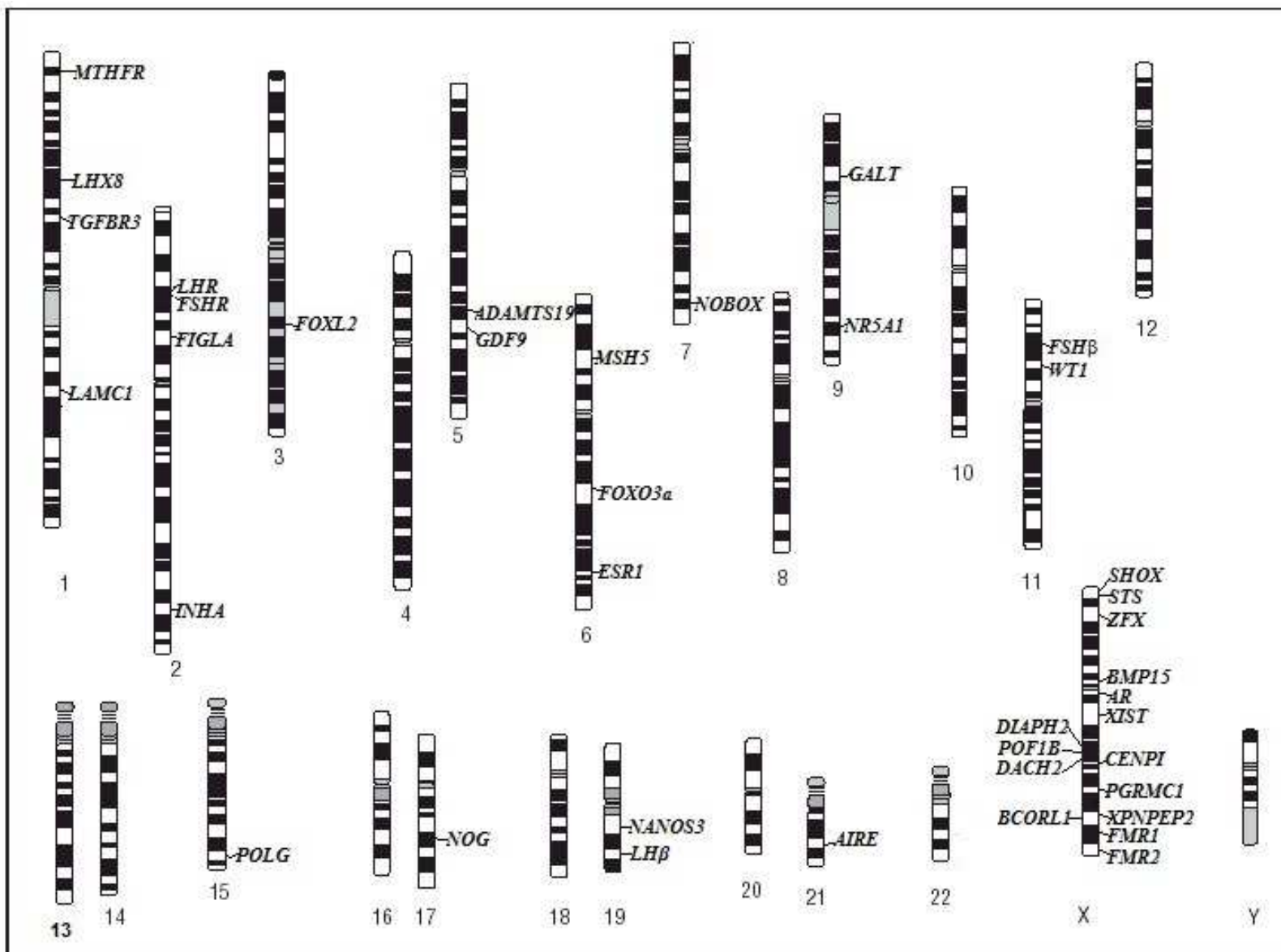
**Tabel 1. POF-i kandidaatgeenid X kromosoomis ja autosoomides, nende asukoht ning funktsioon** (Beke et al., 2013; Dixit et al., 2010; Goswami ja Conway, 2005; Quilter et al., 2010, [www.omim.org](http://www.omim.org)<sup>1</sup> järgi)

Geen	Geeni asukoht	Viide	Geeni funktsioon/seos POF-ga
<b>X kromsoom</b>			
<i>SHOX</i>	Xp22.33	(Tachdjian et al., 2008)	<i>SHOX</i> geeni defektid on seotud idiopaatilise kasvu pidurdumise ja lühikese kasvu fenotüübiga Turneri sündroomi puhul.
<i>STS</i>	Xp22.31	(Quilter et al., 2010)	Geeni üleekspresseerimine võib viia liigsele östrogeeni tootmisele, mis võib maha suruda LH ja FSH produktsiooni.
<i>ZFX</i>	Xp22.1	(Luoh et al., 1997; Quilter et al., 2010)	<i>ZFX</i> kodeerib ubikvitineeritult ekspresseeritud teadmata funktsiooniga tsink sõrme seoselist transkriptsioonifaktorit. Nullmutatsiooniga hiirtel on vähem ootsüüte ja madalam reproduktiivne eluiga.
<i>BMP15</i>	Xp11.2	(Di Pasquale et al., 2004)	<i>BMP15</i> reguleerib folliikulite küpsemist, nende tundlikkust FSH-le, sugurakkude apoptoosi ja ovulatsiooni.
<i>AR</i>	Xq12	(Chatterjee et al., 2009)	Ekspresseeritakse munasarjades, peamiselt granuloosarakkudes. Võimalik seotus follikulogeneesiga.
<i>XIST</i>	Xq13	(Yoon et al., 2008)	Seostatakse munasarjade arenguks oluliste geenide haplopuudulikkusega.
<i>DIAPH2/DIA</i>	Xq21	(Bione et al., 1998)	Vastutav munasarjade normaalse talitluse ja arengu eest. Mutatsioonid selles geenis võivad häirida folliikulite küpsemist.
<i>POF1B</i>	Xq21.2	(Bione et al., 2004; Lacombe et al., 2006)	<i>POF1B</i> omab kriitilist tähtsust varastes munasarjade formeerumise protsessides kuni sugurakkude moodustumiseni välja.
<i>DACH2</i>	Xq21.3	(Bione et al., 2004)	Kodeeritav valk võib olla seotud organogeneesi ja müogeneesi regulatsiooniga ja osaleda POF-i tekkes.
<i>CENPI</i>	Xq22.1	(Beke et al., 2013)	Kriitilise tähtsusega kromosoomide eraldumise faasis ning deletsioon selles geenis võib häirida munasarjade arengut ning gametogeneesi.

<i>PGRMC1</i>	Xq24	(Mansouri et al., 2008)	Kodeerib oletatavat membraanseoselist progesterooni retseptorit.
<i>XPNPEP2</i>	Xq26.1	(Prueitt et al., 2000)	Kodeerib proliini peptidaasi. Translokatsioon võib viia POF-i kujunemiseni.
<i>BCORL1</i>	Xq26.1	(Beke et al., 2013; Quilter et al., 2010)	Deletsioon selles geenis võib viia apoptoosi repressorite vähesuseni, mistõttu võib see avalduda munasarja folliikulite atreesias.
<i>FMR1</i>	Xq27.3	(Tosh et al., 2014; Wittenberger et al., 2007)	Ootsüütides ekspresseeritav geen, mille premutatsioon (CGG trinukleotiidsete korduste arvu suurenemine 5' mittetransleeritavas alas) võib põhjustada POF-i.
<i>FMR2</i>	Xq28	(Murray et al., 1999)	<i>FMR2</i> funktsioon ootsüütide arengus on veel selgusetu, kuid deletsioonid selles piirkonnas viivad vigase valguprodukti moodustumisele.
<b>Autosoomid</b>			
<i>MTHFR</i>	1p36.22	(Rah et al., 2012; Rosen et al., 2007)	<i>MTHFR</i> on seotud vähenenud rakujagunemiste ja apoptoosiga. Mutatsioonid selles geenis võivad viia munasarjade funktsiooni vähenemiseni ja FSH taseme suurenemiseni.
<i>LHX8</i>	1p31.1	(Qin et al., 2008)	LIM homeodomeeni transkriptsiooni regulaator, mida peamiselt ekspresseeritakse sugurakkudes ja on vajalik imetajate oogeneesis.
<i>TGFBR3</i>	1p22.1	(Dixit et al., 2006a)	Mutatsioonid selles geenis viivad inhibiitiin-vahendatud FSH allareguleerimiseni.
<i>LAMC1</i>	1q25.3	(Pyun et al., 2012)	<i>LAMC1</i> reguleerib steroidhormoonide sünteesi, võimalik seotus follikulogeneesiga. Kõrge ekspressioonitase ovulatsiooni ajal.
<i>LHR</i>	2p16.3	(Cordts et al., 2011)	LH retseptor on vajalik folliikuli küpsemiseks ja ovulatsiooniks.
<i>FSHR</i>	2p16.3	(Aittomäki et al., 1995)	FSH retseptor on ekspresseeritud munasarja granuloosarakkudes ja osaleb follikulaarses arengus.
<i>FIGLA</i>	2p13.3	(Zhao et al., 2008)	Reguleerib rebukesta ( <i>zona pellucida</i> ) geenide ekspressiooni ning ka teisi ootsüüdispetsiifilisi geene, mis on olulised primordiaalse folliikulite formeerumisel.
<i>INHA</i>	2q35	(Corre et al., 2009)	Sugunäärme hormoon, mis inhibeerib FSH sünteesi ja sekretsiooni ajuripatsist.
<i>FOXL2</i>	3q22.3	(Harris et al., 2002)	<i>FOXL2</i> on oluline munasarjade somaatiliste rakkude diferentseerumises ja hilisemas folliikuli arengus ja/või säilitamises.
<i>ADAMTS19</i>	5q23.3	(Knauff et al., 2009)	Sugunäärmete moodustumine ja funktsioneerimine. Võimalik seotus ovulatsiooniprotsessi ning follikulogeneesiga.
<i>GDF9</i>	5q31.1	(Dixit et al., 2005)	<i>GDF9</i> ekspresseeritakse ootsüütides ja on vajalik munasarjade follikulogeneesis, eriti primordiaalse folliikulite staadiumis.

<i>MSH5</i>	6p21.3	(Mandon-Pépin et al., 2008)	<i>Msh5</i> knock-out hiired on viljatud, nende ootsüüdid vähenevad vanusega. <i>MSH5</i> geeni teises eksonis on leitud heterosügootne missensmutatsioon, mis viib POF-ni.
<i>FOXO3a</i>	6q21	(Gallardo et al., 2008; Liu et al., 2007)	Primordiaalse folliikulite aktivatsiooni supressor ja regulaator. Samuti seotud <i>BMP15</i> geeni regulatiivse aktiivsusega.
<i>ESR1</i>	6q25.1	(Bretherick et al., 2008; Yoon et al., 2010)	Osaleb follikulogeneesis, alleelide erinevused häirivad östrogeeni bioloogilist funktsiooni.
<i>NOBOX</i>	7q35	(Qin et al., 2007; Rajkovic et al., 2004)	Ootsüüdispetsiifiline homeobox geen, mis on oluline varases follikulogeneesis.
<i>GALT</i>	9p13.3	(Guerrero et al., 2000)	Munasarjade kahjustumine võib tuleneda galaktoosi metaboliitide toksilisest mõjust.
<i>NR5A1</i>	9q33.3	(Jiao et al., 2013; Lourenço et al., 2009)	Tuuma retseptor, mitmete hüpotaalamus-hüpofüüs-munasarja teljel olevate geenide transkriptsiooni regulaator.
<i>FSHβ</i>	11p14.1	(Matthews et al., 1993)	FSH β-subühik on oluline seondumaks FSH retseptoriga. FSH struktuuri muutused võivad viia viljatuseeni.
<i>WT1</i>	11p13	(Gao et al., 2014)	Ekspressseeritakse varases folliikuli staadiumis, geeni üleekspressseerumine surub alla inhibiini α geeni promootori aktiivsust.
<i>POLG</i>	15q26.1	(Bonomi et al., 2012; Pagnamenta et al., 2006)	Mutatsioon selles geenis viib üldise mtDNA replikatsiooni kahjustumiseni ja mitokondrite vähenemiseni, mida vajatakse eelkõige follikulogeneesi vältel.
<i>NOG</i>	17q22	(Kosaki et al., 2004)	Ekspressseeritakse munasarjades ja interakteerub luu morfogeneesi valkudega.
<i>NANOS3</i>	19p13.13	(Wu et al., 2013)	<i>NANOS3</i> kodeerib RNA-seoselist valku, mis on oluline primordiaalse folliikulite arengus ja püsimises.
<i>LHβ</i>	19q13.33	(Takahashi et al., 1999)	Mutatsioonid <i>LHβ</i> geenis on seotud hüpogonadismiga, mida iseloomustab viljatus ning pseudohermafrodisim.
<i>AIRE</i>	21q22.3	(Laml et al., 2002)	Autoantikehade tootmine steroidhormoone sekreteerivatele rakkudele.

## LISA 2



Joonis 1. Antud töös kirjeldatud geenide kaart.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Katre Teearu (sünnikuupäev: 21.11.1989),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Enneaegne ovariaalpuudulikkus ja selle geneetilised põhjused“, mille juhendaja on prof. Ants Kurg, PhD.,
  - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014